

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DA MÃE AO FILHO:
AVALIAÇÃO DE RESULTADOS DE UM PROTOCOLO LABORATORIAL
IMPLEMENTADO A NÍVEL NACIONAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA
INFEÇÃO EM CRIANÇAS NASCIDAS DE MÃES INFETADAS**

Gabriel Fernandes Mendes

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Elizabeth Pádua, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

Quero expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram e apoiaram esta etapa tão importante da minha vida.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família, em particular aos meus pais, ao meu irmão, aos meus avós e aos meus tios. Todos vocês contribuíram para que tudo isto fosse possível, e um obrigado nunca será suficiente para traduzir a gratidão que sinto. Felizmente, nunca me faltou nada, e é graças a todos vocês e a todos os vossos exemplos e conselhos que sou a pessoa que sou hoje.

À Doutora Elizabeth Pádua, do INSA, pela oportunidade que me deu de realizar este estudo e pela sua orientação. Muito obrigado pela sua enorme disponibilidade, apoio, simpatia, compreensão e por todos os conhecimentos transmitidos. Obrigado pela oportunidade de fazer investigação num centro de excelência onde fui sempre bem recebido. Foi uma experiência única, incrivelmente enriquecedora e importantíssima na minha vida académica e certamente no meu futuro.

À Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, da FCUL, um muito obrigado por ter aceite a coorientação deste projeto, pelos seus conselhos e sugestões, tempo dispensado e pelos conhecimentos científicos e profissionais transmitidos ao longo destes dois anos.

À Catarina Almeida e à Ivone Água-Doce, do INSA, pela vossa enorme ajuda, boa disposição e pela vossa paciência para me ensinar tudo no laboratório.

À Doutora Helena Cortes-Martins, do INSA, pela sua disponibilidade e orientação na utilização do programa Epi Info™.

Ao Miguel Pinto, do INSA, pelo seu contributo para a construção do alinhamento de sequências de suporte para a construção da árvore filogenética concatenada.

A todo o restante pessoal do INSA, dos vários departamentos, pela vossa disponibilidade e ajuda demonstrada.

A todos os meus amigos, por todo o carinho, palavras de apreço, incentivo e apoio ao longo de todos estes anos. Vocês são a família que eu pude escolher. Quero agradecer em especial aos meus amigos com qual partilhei casa, pela constante motivação, entreaajuda e por todos os bons momentos partilhados.

Um sincero obrigado a todos vocês.

RESUMO

Em 2017, a estimativa da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) foi de 1,8 milhões em crianças e adolescentes, sendo que a via de transmissão mãe-filho (TMF) foi o principal modo de aquisição da infecção nesta população. Entre outros fatores, as elevadas taxas de mutação e recombinação genética durante a replicação viral resultam numa grande variabilidade e diversidade de variantes do VIH, que interferem negativamente na eficácia do tratamento, no diagnóstico molecular e na produção de vacinas. Atendendo a que as medidas de prevenção têm reduzido significativamente a taxa da TMF do VIH para valores inferiores a 2%, tem sido objetivo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a continuação da implementação de medidas que contribuam para a eliminação desta via de transmissão.

O presente estudo teve duas fases de desenvolvimento: uma primeira fase experimental e técnica para diagnóstico precoce da TMF entre outubro de 2017 e março de 2018, e uma segunda fase de análise de dados recolhidos entre 2006 e 2016, através do protocolo laboratorial para estudo da TMF do VIH-1 e VIH-2.

Os principais objetivos foram diagnosticar os casos de TMF e caracterizar molecularmente os vírus transmitidos da mãe ao recém-nascido durante a primeira fase do estudo, e na segunda fase, determinar a evolução das taxas anuais da TMF entre 2006-2016, caracterizar a população de acordo com dados epidemiológicos conhecidos e regimes de terapia antirretrovírica (TAR) de prevenção administrados, bem como analisar outros indicadores que podem influenciar a transmissão VIH da mãe ao filho.

Entre outubro de 2017 e março de 2018 foi diagnosticado um caso de TMF do VIH-1 (CRF14_BG) e identificadas 4 mutações de resistência a inibidores da protease. Entre 2006 e 2016, a análise realizada a 2250 crianças estudadas mostrou uma variação de taxas de TMF do VIH entre um mínimo de 0,6% (em 2012) e um máximo de 3,8% (em 2015).

A taxa global de TMF foi de 7,8% na população que não cumpriu medidas de TAR de prevenção e de 0,5% na que aderiu aos protocolos de prevenção ($p=0,001$). Apenas ocorreu um caso de TMF do VIH-2 (0,9%). A infecção materna por VIH-2 foi associada a mães de naturalidade africana ($p=0,001$), com média de idade (33,0 anos) e tempo médio de infecção (9,7 anos) superiores, comparativamente a mães infetadas por VIH-1. Em termos epidemiológicos verificou-se uma elevada proporção (38,4%) de crianças com ascendência africana, incluindo as crianças em risco de infecção por VIH-1. Observou-se que na maioria (86,9%) das crianças estudadas foi administrado zidovudina (AZT) como medida profilática, tendo-se verificado, a partir de 2011, uma redução na duração da profilaxia de 6 para 4 semanas.

Durante todo o período de estudo, verificou-se que a maioria dos regimes TAR administrados na gravidez eram uma combinação de inibidores da transcriptase reversa com inibidores da protease (69,8%), mas que nos últimos 4 anos se observou um aumento de casos com introdução de inibidores da integrase (4,5%). Porém, em 23,0% das crianças em risco de infecção VIH não foram cumpridas as medidas de prevenção na gravidez. Em 45,0% dos casos, não foi administrada TAR, em 43,6% iniciada tardiamente na gravidez e em 11,4% a toma foi irregular, verificando-se respetivamente nestes grupos que, 41,2%, 46,9% e 55,9% eram crianças de ascendência portuguesa.

A transmissão do VIH-1 foi associada a ausência de TAR ($p=0,001$), a carga viral detetável na gravidez ($p=0,001$) e a uma contagem de células T CD4⁺ <350 células/mm³ ($p=0,036$).

Estes resultados confirmam a importância da adesão às medidas de prevenção da TMF do VIH e enfatiza a importância do diagnóstico precoce em mulheres em idade fértil para permitir a intervenção preventiva atempada e evitar a transmissão do VIH.

Rastreios pré-natais de VIH são componentes cruciais na prevenção da TMF, permitindo avaliar e monitorizar o estado clínico da mulher infetada e iniciar/ajustar os regimes antirretrovíricos para tratamento ou prevenção da TMF. Medidas concretas a implementar para a redução da elevada proporção de grávidas que não cumpre TAR de prevenção pode ser uma excelente estratégia a seguir e contribuir para a eliminação da via de TMF do VIH em Portugal.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), Transmissão Mãe-Filho (TMF), Terapia Antirretrovírica, Portugal

ABSTRACT

In 2017, the estimated infection with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) was 1.8 million in children and teenagers, being the mother-to-child transmission (MTCT) the main source of infection in this population. Among other factors, the high mutation and recombination rates during viral replication result in a great genetic variability and diversity of HIV strains, interfering negatively with the effectiveness of therapy, the molecular diagnosis and the production of vaccines. Given that prevention measures have significantly reduced the rate of HIV MTCT to below 2%, the World Health Organization (WHO) recommended the continuous implementation of measures that contribute for the elimination of this route of transmission.

The present dissertation had two approaches: a first experimental and technical phase for early diagnosis of MTCT between October 2017 and March 2018, and a second phase of analysis of the data collected between 2006 and 2016, applying the laboratory protocol for the study of HIV-1 and HIV-2 MTCT.

The main objectives were to diagnose MTCT cases and to molecularly characterize the viruses transmitted from the mother to the newborn during the first phase of the study, and in the second phase, determine the evolution of the annual MTCT rates between 2006-2016, characterize the population, according to known epidemiological data and administered antiretroviral therapy (ART) regimens, as well as to analyze other indicators that may influence mother-to-child transmission of HIV.

Between October 2017 and March 2018, a case of HIV-1 MTCT (CRF14_BG) was diagnosed and 4 resistance mutations against protease inhibitors were identified. Between 2006 and 2016, the analysis of 2250 children studied showed a variation of HIV MTCT rates between a minimum of 0,6% (in 2012) and a maximum of 3,8% (in 2015).

The overall rate of MTCT was 7,8% in the population that did not comply with ART prevention measures and 0,5% for the population that followed the prevention protocols ($p=0,001$). Only one case of HIV-2 MTCT (0,9%) occurred. Maternal HIV-2 infection was associated with mothers of African origin ($p=0,001$), which presented a higher mean age (33,0 years) and mean time to infection (9,7 years) when compared with HIV-1 infected mothers. In epidemiological terms, it was found a high proportion (38,4%) of children with African ancestry, including the children at risk of HIV-1 infection. It was observed that in the majority (86,9%) of the studied children, zidovudine (ZDV) was administered as a prophylactic measure, and from 2011, it was observed a reduction in the duration of prophylaxis from 6 to 4 weeks.

Throughout the study period, most of the ART regimens administered in pregnancy were a combination of reverse transcriptase inhibitors with protease inhibitors (69,8%), but in the last 4 years it was observed an increase in regimens with integrase inhibitors (4,5%). However, for 23,0% of children at risk of HIV infection, the prevention measures were not carried out in pregnancy. In 45,0% of the cases, ART was not administered, in 43,6% the patients started ART late in pregnancy and in 11,4% the implementation was irregular, being verified in these groups that 41,2%, 46,9% and 55,9%, respectively, were children with Portuguese ancestry.

HIV-1 transmission was associated with absence of ART ($p=0,001$), detectable viral load ($p=0,001$), and CD4 cell count <350 cells/mm³ ($p=0,036$).

These results confirm the importance of adherence to measures for prevention of MTCT of HIV and emphasize the importance of early diagnosis in women at fertile ages to allow timely preventive intervention and to avoid HIV transmission.

Prenatal HIV screenings are crucial components for the prevention of MTCT, allowing an assess and monitoring of the clinical status of the infected woman and to initiate/adjust antiretroviral regimens for treatment or prevention of MTCT. Implementing concrete measures to reduce the high proportion of pregnant women who do not comply with ART prevention can be an excellent strategy to follow and contribute for the elimination of MTCT of HIV in Portugal.

KEY WORDS: Human Immunodeficiency Virus (HIV), Mother-to-Child Transmission (MTCT), Antiretroviral Therapy, Portugal.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS.....	IX
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)	2
1.1 Origem	2
1.2 Classificação, organização genômica e morfologia do virião	3
1.3 Genes <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i> e <i>nef</i>	3
1.4 Ciclo replicativo.....	6
1.5 Marcadores e estádios de infecção	7
1.6 Epidemiologia e distribuição mundial de genótipos	8
1.7 Vias de transmissão.....	10
1.7.1 Transmissão mãe-filho do VIH.....	10
1.7.1.1 Diagnóstico precoce em recém-nascidos.....	10
1.7.1.2 TAR de prevenção e sua influência nas taxas de transmissão	11
1.7.1.3 Papel das resistências aos antirretrovirais	14
II. OBJETIVOS	17
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Amostras analisadas e recolha de dados.....	20
2. Preparação das amostras no laboratório	22
2.1 Separação das células mononucleadas do sangue periférico	22
2.2 Extração do DNA das CMSP	22
3. Amplificação de diferentes regiões genômicas do VIH	23
3.1 No diagnóstico da infecção por VIH	23
3.1.1 Amplificação da região LTR e <i>pol</i> do VIH-1	23
3.1.2 Amplificação da região LTR e <i>pol</i> do VIH-2	25
3.2 Regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i> e <i>nef</i> para caracterização molecular do VIH-1	27
3.2.1 Amplificação da região <i>gag</i> do VIH-1	27
3.2.2 Amplificação das regiões do gene <i>pol</i> (PR e RT) do VIH-1	29
3.2.3 Amplificação da região da integrase do VIH-1	31
3.2.4 Amplificação da região <i>env</i> do VIH-1	32
3.2.5 Amplificação do gene <i>nef</i> do VIH-1	33
4. Visualização dos produtos amplificados	34
5. Purificação e Sequenciação dos produtos amplificados utilizados na caracterização molecular do VIH-1	35

6. Análise das sequências nucleotídicas das regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i> e <i>nef</i> do VIH-1	35
6.1 Construção de sequências consenso.....	35
6.2 Inferência filogenética e classificação das sequências	35
IV. RESULTADOS.....	36
1. Processamento de amostras recebidas no laboratório no âmbito de diagnóstico precoce da TMF do VIH, entre 1 de outubro de 2017 a 31 de março de 2018.....	37
1.1 Proveniência e análise epidemiológica das amostras analisadas	37
1.2 Caracterização das amostras atendendo às medidas de prevenção da TMF do VIH	37
1.3 Diagnóstico precoce de TMF do VIH-1 e VIH-2	37
1.4 Caracterização molecular do VIH-1 no par de amostras mãe-filho positivas.....	38
1.4.1 Amplificação, sequenciação e construção de sequências de consenso para as regiões genómicas em estudo.....	38
1.4.2 Classificação VIH-1 por filogenia	39
1.4.3 Análise de mutações de resistência para a região alvo dos antirretrovirais.....	41
2. Estudo da população de crianças em risco de infeção por VIH, entre 2006 e 2016	42
2.1 A População e a proveniência das amostras	42
2.2 Análise de dados epidemiológicos recolhidos	42
2.3 Avaliação do estado imunitário e da quantificação do RNA VIH-1 na população materna	44
2.4 TAR na prevenção da transmissão do VIH	45
2.4.1 Profilaxia antirretrovírica no recém-nascido	45
2.4.2 Cumprimento de TAR de prevenção na gravidez.....	46
2.4.3 Tipos de regime de TAR administrados na gravidez	47
2.4.4 Análise da TAR de prevenção com os valores de T CD4 ⁺ e de RNA VIH-1.....	49
2.5 Taxas de transmissão mãe-filho do VIH, globais e anuais, entre 2006 e 2016.....	50
2.6 Análise epidemiológica, clínica e virológica na população de mães	52
transmissoras e não transmissoras do VIH aos seus filhos	52
V. DISCUSSÃO.....	54
1. Diagnóstico precoce da TMF do VIH, entre 1 de outubro de 2017 a 31 de março de 2018	55
2. Estudo da transmissão mãe-filho do VIH, entre 2006 e 2016	57
VI. CONCLUSÃO.....	63
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Organização genômica do VIH-1.....	3
FIGURA 1.2 – Estrutura da poliproteína precursora Pr55 ^{gag}	3
FIGURA 1.3 – Esquema estrutural da transcriptase reversa do VIH-1	4
FIGURA 1.4 – Representação esquemática da glicoproteína gp120	5
FIGURA 1.5 – Esquema ilustrativo do ciclo replicativo de VIH com indicação dos locais de ação de inibidores da sua replicação	6
FIGURA 1.6 – História natural de uma infecção por VIH	7
FIGURA 1.7 – Distribuição global dos subtipos e recombinantes de VIH-1	8
FIGURA 1.8 – Marcadores de infecção do VIH-1	11
FIGURA 1.9 – Número de crianças e adolescentes (< 15 anos) a receberem tratamento antirretrovírico em todo o mundo. Dados da OMS, 2000-2015	13
FIGURA 1.10 – Lista das principais mutações de resistência às classes INTR e INNTR do VIH-1	15
FIGURA 1.11 – Lista das principais mutações de resistência à classe IIN do VIH-1	15
FIGURA 1.12 – Lista das principais mutações de resistência à classe IP do VIH-1	16
FIGURA 3.1 – Algoritmo laboratorial para diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho do VIH.....	21
FIGURA 4.1 – Produtos resultantes da segunda amplificação para VIH-1 e VIH-2, visualizados em gel de agarose.....	38
FIGURA 4.2 – Análise de produtos amplificados para várias regiões genômicas do VIH-1 a partir das amostras da criança e respetiva mãe	39
FIGURA 4.3 – Árvore filogenética concatenada construída a partir de um alinhamento de sequências contendo as regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> (RT e IN), <i>env</i> e <i>nef</i> de VIH-1.....	40
FIGURA 4.4 – Características epidemiológicas (sexo, naturalidade e idade materna) do total de crianças em risco de infecção e agrupadas atendendo ao ano de nascimento e tipo de vírus (VIH-1 e VIH-2) para o período 2006-2016.....	43
FIGURA 4.5 – Distribuição dos casos atendendo ao número de células T CD4 ⁺ na população de mães infetadas com VIH-1 ou VIH-2.....	44
Figura 4.6 – Distribuição dos casos com carga viral detetável na população materna infetada por VIH-1	44
FIGURA 4.7 – Distribuição das crianças que cumpriram regime profilático de prevenção da TMF de 4 ou 6 semanas, entre 2006 e 2016	45
FIGURA 4.8 – Distribuição das crianças atendendo a dois tipos de regimes profiláticos TAR de prevenção administrados com maior frequência entre 2006 e 2016.....	46

FIGURA 4.9 – Distribuição das crianças atendendo ao cumprimento de TAR de prevenção na gravidez (sim, não e não refere (NR)) entre 2006-2016	47
FIGURA 4.10 – Distribuição dos regimes TAR de prevenção na gravidez (R1, inibidores RT (INTR e INNTR); R2, inibidores RT+ inibidores PR) e Outros (R3 + R4) entre o período de 2006 e 2016	48
FIGURA 4.11 – Distribuição dos regimes TAR de prevenção na gravidez (R3, inibidores da RT+PR+IN e R4, inibidores RT+IN) entre o período de 2006 e 2016	48
FIGURA 4.12 – Contagem de células T CD4 ⁺ em função do cumprimento de TAR de prevenção durante a gravidez, na população de mães infetadas por VIH.....	49
FIGURA 4.13 – Quantificação de RNA VIH-1 em função do cumprimento TAR de prevenção na gravidez na população de mães infetadas por VIH-1.....	50

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1 – Mistura de reação usada para amplificação da região LTR do VIH-1.....	23
TABELA 3.2 – Mistura de reação usada para amplificação da região <i>pol</i> do VIH-1	24
TABELA 3.3 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região LTR do VIH-1	24
TABELA 3.4 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região <i>pol</i> do VIH-1.....	25
TABELA 3.5 – Mistura de reação usada para amplificação da região LTR do VIH-2	25
TABELA 3.6 – Mistura de reação usada para amplificação da região <i>pol</i> do VIH-2	26
TABELA 3.7 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região LTR do VIH-2	26
TABELA 3.8 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região <i>pol</i> do VIH-2.....	27
TABELA 3.9 – Mistura de reação usada para a primeira e segunda amplificação da região <i>gag</i> do VIH-1	28
TABELA 3.10 – Programa de amplificação utilizado para a primeira e segunda amplificação da região <i>gag</i> do VIH-1	28
TABELA 3.11 – Mistura de reação usada para a primeira amplificação da região <i>pol</i> (PR) do VIH-1 ..	29
TABELA 3.12 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região <i>pol</i> (PR) do VIH-1..	29
TABELA 3.13 – Mistura de reação usada para a primeira e segunda amplificação da região <i>pol</i> (RT) do VIH-1	30
TABELA 3.14 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região <i>pol</i> (RT) do VIH-1..	30
TABELA 3.15 – Mistura de reação usada para a primeira amplificação da região <i>pol</i> (IN) do VIH-1 ..	31
TABELA 3.16 – Mistura de reação usada para a segunda e terceira amplificação da região <i>pol</i> (IN) do VIH-1	31
TABELA 3.17 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região <i>pol</i> (IN) do VIH-1..	32
TABELA 3.18 – Mistura de reação usada para a primeira e segunda amplificação da região <i>env</i> do VIH-1	32
TABELA 3.19 – Programa de amplificação utilizado para amplificação da região <i>env</i> do VIH-1	33
TABELA 3.20 – Mistura de reação usada para a primeira e segunda amplificação da região <i>nef</i> do VIH-1	33
TABELA 3.21 – Programa de amplificação utilizado para amplificação do gene <i>nef</i> do VIH-1	34
TABELA 4.1 – Mutações identificadas para a região RT, PR e IN no par de amostras mãe-filho em comparação com a sequência de referência HXB2	41
TABELA 4.2 – Taxa da TMF do VIH obtida em cada ano de estudo, entre 2006 a 2016.....	50
TABELA 4.3 – Distribuição dos casos de transmissão mãe-filho de VIH-1, de acordo com o cumprimento de TAR de prevenção na gravidez entre 2006 e 2016.....	51
TABELA 4.4 – Características epidemiológicas e clínicas da população de mães transmissoras e não transmissoras do VIH aos seus filhos, bem como das crianças em risco de infeção e crianças verticalmente infetadas	52

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
CA	Proteína da cápside
CCR5	Recetor C-C da quimiocina tipo 5
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
CRF	Formas recombinantes em circulação, do inglês <i>Circulating recombinant forms</i>
CXCR4	Recetor C-X-C da quimiocina tipo 4
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFV	Efavirenze
FTC	Emtricitabina
HAART	Terapia antirretrovírica de alta eficácia, do inglês <i>Highly active anti-retroviral therapy</i>
IDV	Indinavir
IIN	Inibidor da integrase, do inglês <i>Integrase inhibitor</i>
IN	Integrase
INNTR	Inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa, do inglês <i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
INTR	Inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, do inglês <i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>

IP	Inibidor da protease, do inglês <i>Protease inhibitor</i>
ITR	Inibidor da transcriptase reversa
LPV	Lopinavir
LTR	Regiões repetitivas terminais longas, do inglês <i>Long terminal repeats</i>
MA	Proteína da matriz
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHCI	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I, do inglês <i>Major histocompatibility complex class I</i>
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NC	Proteína da nucleocápside
NUTS II	Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos de nível II
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PR	Protease
RAL	Raltegravir
RNA	Ácido ribonucleico
RNase H	Ribonuclease H
RPM	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase</i>
RTV	Ritonavir
s	Segundos
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SQV	Saquinavir
SU	Glicoproteína da superfície
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAR	Terapia antirretrovírica
TARc	Terapia antirretrovírica combinada
T CD4⁺	Células T auxiliares
T CD8⁺	Células T citotóxicas
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
TM	Glicoproteína transmembranar
TMF	Transmissão mãe-filho
U	Unidade
URF	Formas virais recombinantes únicas, do inglês <i>Unique recombinant forms</i>
V	Volts
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VIH-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
VIH-2	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2
VIS	Vírus da Imunodeficiência Símia
VIS_{cpz}	Vírus da Imunodeficiência Símia dos chimpanzés
VIS_{sm}	Vírus da Imunodeficiência Símia dos <i>sooty mangabeys</i>

I. INTRODUÇÃO

1. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (VIH)

O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ^[1], uma doença infecciosa que representa uma grande ameaça à saúde pública ^[2], tendo um impacto preocupante nos sectores sociais e económicos a nível global.

O VIH é um retrovírus humano ^[3], sendo reconhecidos dois tipos distintos de vírus, o tipo 1 (VIH-1) e o tipo 2 (VIH-2). Estes tipos virais são distinguidos entre si com base na sua organização a nível genómico, relações filogenéticas, características clínicas, infecciosas e de virulência, ou ainda, pela sua distribuição geográfica, apresentando, no entanto, uma morfologia e estrutura semelhantes ^[3, 4, 5].

A primeira pista sobre a etiologia da doença surgiu no início da década de 80, mais precisamente em 1983, no Instituto Pasteur em Paris, quando foi descoberto uma nova estirpe viral, pela investigadora Barré-Sinoussi, em colaboração com Jean Chermann e Luc Montagnier ^[1]. Após 3 anos, foi isolado um segundo tipo de vírus causador de SIDA, denominado VIH-2, em indivíduos com SIDA originários da África Ocidental ^[6].

De acordo com os dados disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde, mais de 35 milhões de pessoas já morreram infetadas pelo VIH. Em 2017, existia cerca de 36,9 milhões de pessoas infetadas em todo o mundo, sendo a zona de África a região mais afetada, correspondendo a mais de 2/3 do número total dos infetados ^[7].

1.1 ORIGEM

Ainda que a origem da infeção VIH no Homem não seja totalmente conhecida, várias evidências científicas indicam que o vírus infetou a população humana devido a múltiplas transmissões zoonóticas a partir do Vírus da Imunodeficiência dos Simios (VIS) ^[8], ocorrendo os eventos da sua transmissão entre primatas não humanos e humanos, na África Ocidental e Central no início do século XX ^[8]. Contudo, ao contrário do que acontece com o VIH, o VIS parece não causar doença nos seus hospedeiros naturais ^[2].

Estudos filogenéticos revelam uma proximidade do VIH-1 com o VIS isolado dos chimpanzés (VIS_{cpz}), da subespécie *Pan troglodytes troglodytes*. Estes estudos demonstram ainda uma elevada semelhança genómica entre o VIH-2 e o VIS_{sm}, vírus que infecta o macaco “sooty mangabey”, *Cercocebus atys*. O contacto entre primatas humanos e não humanos durante centenas de anos em África, quer seja devido a elevada frequência de caça destes animais para alimentação humana ou outro tipo de atividades locais, como captura, ou mesmo a utilização destes primatas não humanos como animais de estimação, poderá ser a explicação mais plausível para a passagem do vírus a humanos e para a existência atual de múltiplos grupos e subtipos de VIH dispersos por todo o mundo ^[2, 8, 9].

1.2 CLASSIFICAÇÃO, ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E MORFOLOGIA DO VIRIÃO

A nível taxonómico, ambos os tipos de VIH pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e género *Lentivirus*. Estes dois tipos virais possuem um invólucro e apresentam uma homologia genómica de cerca de 40-50% [10].

O genoma é constituído por duas cópias de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva, com tamanhos próximos dos 10kb, localizadas no interior de uma cápside (CA), com morfologia de cone truncado [10]. Apresenta três genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, dois genes reguladores *tat* e *rev* e quatro genes acessórios *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (**Figura 1.1**) [10, 11]. No caso do VIH-2, o gene *vpx*, substitui o *vpu* do VIH-1 [10, 11].

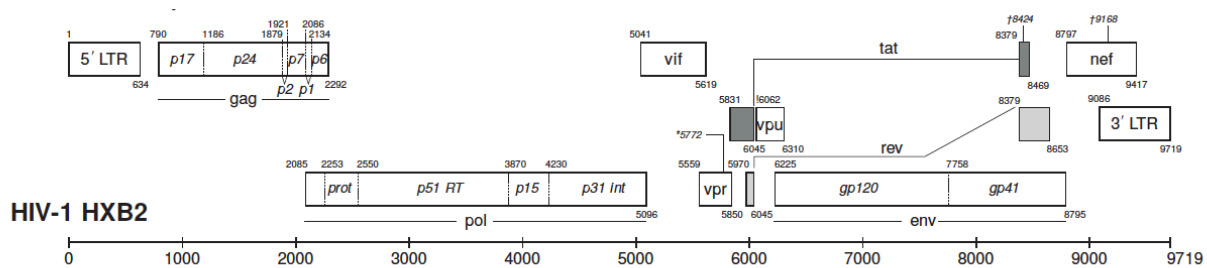


FIGURA 1.1: Organização genómica do VIH-1 (adaptado) [11].

As partículas virais maduras apresentam uma forma esférica, constituídas por um invólucro, por proteínas da matriz e por uma cápside central densa. O invólucro viral, derivado da membrana da célula hospedeira, e à semelhança do que acontece com todos os lentivírus, é constituído por uma bicamada lipídica, composta por glicoproteínas de superfície [12].

1.3 GENES *GAG*, *POL*, *ENV* E *NEF*

a) GENE *GAG*:

O gene *gag* codifica para uma poliproteína precursora, Pr55^{gag}. Esta poliproteína vai ser clivada pela protease viral, gerando-se as proteínas da matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) e p6 [13].

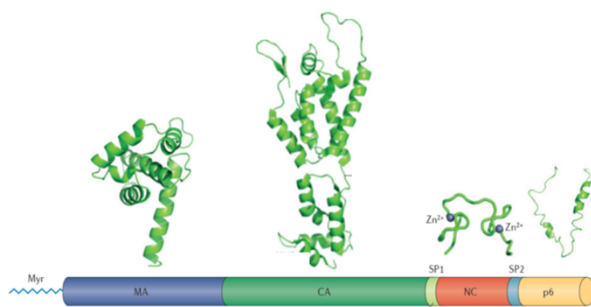


FIGURA 1.2: Estrutura da poliproteína precursora Pr55^{gag} (adaptado) [14].

Nas extremidades do domínio da NC, são ainda gerados dois péptidos espaçadores, denominados spl e sp2 [13, 14, 15] (**Figura 1.2**). O domínio MA do gene *gag*, possui um papel importante na localização e ligação da partícula viral à membrana da célula infetada [14, 15, 16]. O domínio central da CA tem um papel determinante na morfologia da partícula viral [17].

O domínio da NC é responsável pela ligação e encapsidação do RNA nas novas partículas víricas formadas [16]. Por fim, a p6, é responsável pela separação do invólucro do virião da membrana da célula hospedeira [17].

b) GENE *POL*:

O gene *pol* codifica para um poliproteína precursora, Pr160^{gagpol}. Ao ocorrer o processamento proteolítico da Pr160^{gagpol} obtém-se a protease viral (PR), a transcriptase reversa (RT), a ribonuclease H (RNase H) e a integrase (IN) [13].

A protease do VIH é uma enzima responsável pela clivagem dos produtos de poliproteínas dos genes virais *gag* e *pol*, produzindo proteínas estruturais e enzimas indispensáveis para o ciclo replicativo do VIH. Desta forma, o desenvolvimento de fármacos para impedir a clivagem é naturalmente um alvo primário no tratamento da infeção por VIH. No entanto, o VIH através da sua elevada replicação viral proporciona diversas variantes virais capazes de adquirir mutações resistentes aos inibidores da protease. Perante condições de pressão terapêutica, as mutações permitem à protease manter as suas funções, possibilitando a propagação viral [16].

A transcriptase reversa é a enzima responsável pela conversão do RNA vírico em DNA provírico, de dupla cadeia. Apresenta uma subunidade com 66 kDa (p66) e outra com 51 kDa (p51) e possui duas atividades enzimáticas: polimerização de DNA na síntese de cadeias de DNA a partir do modelo de DNA ou RNA e a ribonuclease H (RNase H) que especificamente degrada o RNA de cadeia dupla híbrida RNA/DNA [18, 19, 20]. Dado o seu papel no ciclo replicativo do VIH, a RT tem sido um alvo importantíssimo no desenvolvimento de fármacos, constituindo quase metade dos antirretrovirais disponíveis no mercado para tratamento da infeção VIH [20, 21].

A integrase é uma enzima responsável pela integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira. Ao contrário do que acontece com PR e RT, a IN não possui qualquer análogo nas células hospedeiras. Assim sendo, a infeção viral torna-se altamente dependente da atividade da integrase, sendo a desativação da mesma considerado como um método eficaz de tratamento da infeção VIH/SIDA [22].

A maior subunidade da RT, p66, apresenta os domínios catalíticos (polimerase e RNase H) ao passo que a menor subunidade da RT, p51, apresenta um papel estrutural. O domínio da polimerase, apresenta 4 subdomínios: *fingers*, *palm*, *thumb* e *connection*, assemelhando-se à mão direita humana [19, 20] (Figura 1.3).

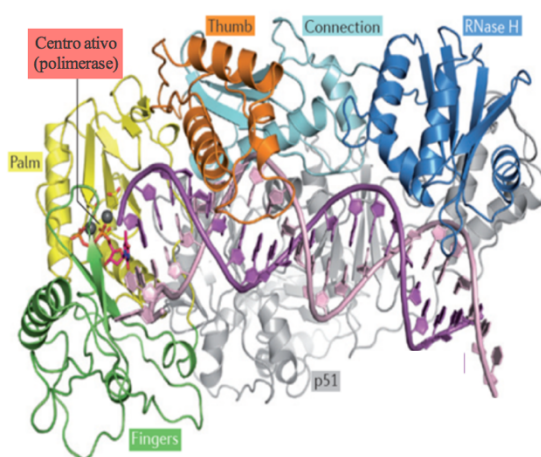


FIGURA 1.3: Esquema estrutural da transcriptase reversa do VIH-1 (adaptado) [19].

c) GENE *ENV*:

O gene *env* codifica para uma glicoproteína, gp160, que é clivada por uma protease celular, originando as glicoproteínas da superfície (SU; gp120) e transmembranar (TM; gp41). As glicoproteínas são responsáveis pela ligação dos viriões ao recetor CD4 e aos coreceptores CCR5 e CXCR4 da célula ^[13]. A ligação do vírus ao recetor celular CD4 ocorre através de interações específicas entre a gp120 e a molécula CD4, conduzindo a alteração conformacional da proteína do vírus, que expõe o domínio hidrofóbico da gp41, promovendo a sua interação com os recetores das quimiocinas, CCR5 ou CXCR4 ^[23, 24].

A glicoproteína TM tem um papel determinante na fusão viral que permite a entrada do vírus na célula. Por outro lado, esta glicoproteína também apresenta um papel na ligação do invólucro à proteína da matriz, necessária para a formação de novos viriões ^[13]. A glicoproteína SU é constituída por um domínio interno e externo, contendo cinco regiões conservadas (C1-C5) intercaladas por cinco domínios altamente variáveis (V1-V5) (**Figura 1.4**). O domínio V3 é o principal determinante na especificidade dos recetores das quimiocinas ^[23, 25].

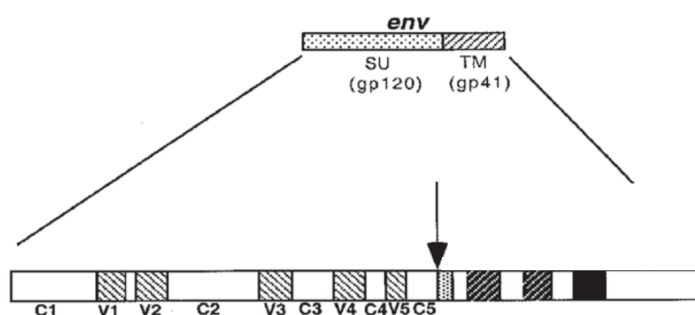


Figura 1.4: Representação esquemática da glicoproteína gp120 (adaptado) ^[25].

A escolha de recetores primários também depende do tropismo das variantes virais. Variantes que usam o coreceptor CXCR4, com tropismo T são denominados de vírus X4 e estirpes que utilizam o coreceptor CCR5 com tropismo M são denominados de R5. As variantes que utilizam ambos os coreceptores e possuem duplo tropismo são designadas de R5X4 ^[25]. As mudanças de variantes virais parecem estar relacionadas com a progressão da doença ^[26, 27, 28], verificando -se que as estirpes R5 com tropismo M poderão estar associadas às fases mais agudas e assintomáticas da infeção por VIH ^[29].

d) GENE *NEF*:

Nef é uma fosfoproteína, com cerca de 27 kDa de peso molecular, predominantemente citoplasmática e ancorada com a membrana plasmática da célula infetada. A proteína Nef apresenta motivos específicos associados a múltiplas funções, entre as quais a regulação negativa de moléculas CD4 e do complexo principal de histocompatibilidade tipo I (MHC I), estimulação da infecciosidade viral e regulação de apoptose nas células infetadas ^[10, 25, 30].

1.4 CICLO REPLICATIVO

O ciclo de replicação de VIH apresenta, tal como todos os lentivírus, duas fases: a fase inicial e a fase tardia ^[5]. A primeira fase corresponde a interações específicas entre as proteínas de origem vírica, presente no invólucro do VIH, e as moléculas recetoras, presentes na membrana citoplasmática da célula alvo ^[5].

Após a entrada na célula as partículas víricas são parcialmente descapsidadas, formando um complexo nucleoproteico. Posteriormente ocorre a ativação da RT, iniciando-se a síntese do DNA complementar (cDNA). O DNA, agora de cadeia dupla, vai ser transportado até ao núcleo, onde vai ser integrado no genoma da célula hospedeira por ação da enzima integrase, conduzindo à formação do DNA provírico ^[5, 31] (**Figura 1.5**).

A fase tardia do ciclo replicativo inicia-se com a transcrição do DNA provírico e com a síntese dos transcritos de RNA mensageiro (mRNA) que vão, posteriormente, ser transportados para junto da membrana plasmática. Junto da membrana, ocorre um processo de automontagem das partículas virais, ocorrendo vários rearranjos, resultando na saída de um virião imaturo para o espaço extracelular, através do processo de gemulação. Finalmente, neste espaço extracelular, ocorre o processo de maturação, envolvendo a clivagem proteolítica sequencial de polipéptidos precursores por parte da protease, finalizando o ciclo de replicação do VIH, com a produção de partículas víricas capazes de infetarem novas células ^[5].

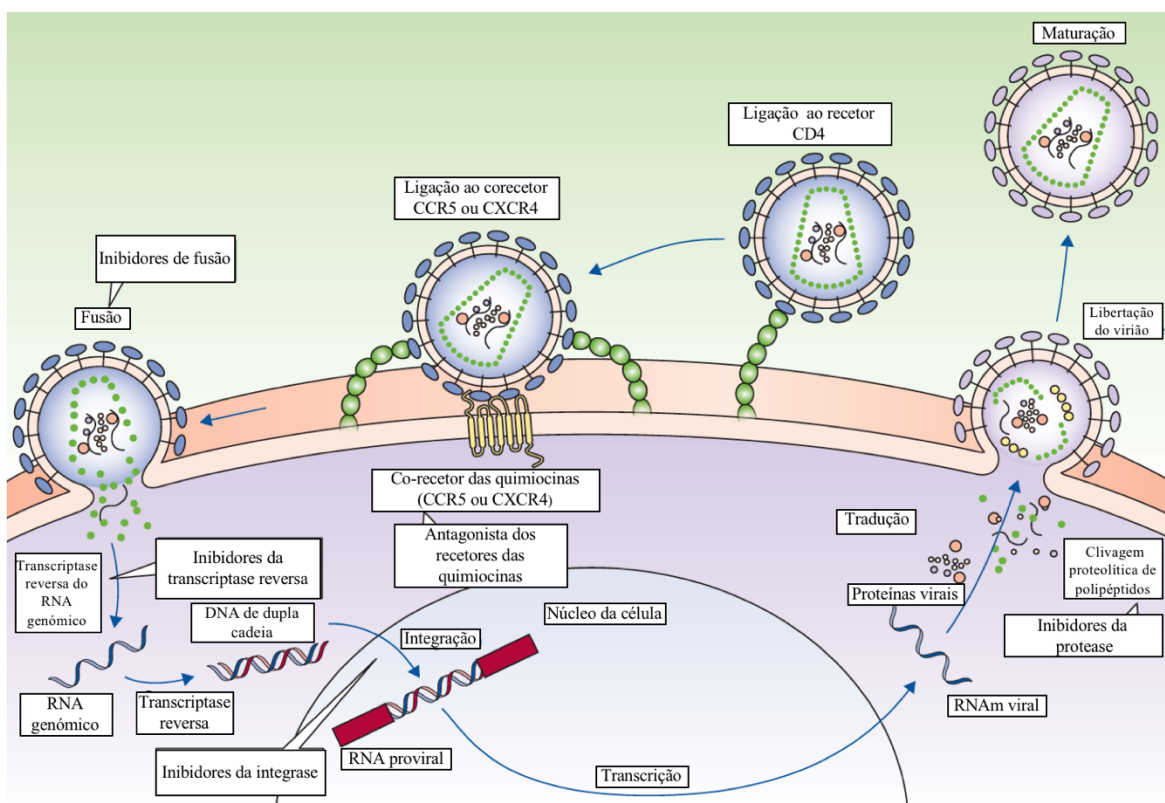


FIGURA 1.5: Esquema ilustrativo do ciclo replicativo de VIH com indicação dos locais de ação de inibidores da sua replicação ^[31].

1.5 MARCADORES E ESTÁDIOS DE INFECÇÃO

A infecção por VIH compreende 3 fases ou estádios distintos: Fase aguda, fase crónica e a fase de doença avançada, que caracteriza o estágio de SIDA (Figura 1.6) [32].

Após a entrada do vírus, sensivelmente metade dos indivíduos infetados apresentam quadro clínico semelhante à mononucleose infecciosa (em particular linfadenopatias). O doente nesta fase apresenta sintomas tipicamente agudos, associados à subida da virémia e acompanhados pela diminuição transitória dos níveis de linfócitos B, células T CD4⁺ e T CD8⁺ [32].

No entanto, algumas semanas após a infecção, existe uma redução de virémia para níveis mais baixos, e uma diminuição da população de células T CD4⁺, verificando ainda a expansão da população T CD8⁺ [31, 32]. A produção de anticorpos e o aumento de marcadores de ativação imunitária também ocorrem durante esta fase [31].

Após a fase de infecção aguda e num indivíduo não tratado, inicia-se um período em média de 8 a 10 anos de infecção crónica assintomática, que corresponde apenas a latência clínica [3, 32]. Nesta fase, os níveis de anticorpos contra o VIH mantêm-se razoavelmente constantes [31]. Não obstante, este período é considerado algo heterogéneo, diferindo entre os indivíduos afetados [32]. Esta fase é marcada por um ligeiro aumento de virémia no sangue, pela perda do número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, à medida que a situação imunológica progride [3, 31, 32].

O último estágio da doença é caracterizado pelo aparecimento de sintomas característicos de SIDA. Ocorre uma intensa replicação viral e uma diminuição da resposta imunológica devido à enorme redução de células T CD4⁺, favorecendo o aparecimento ou reativação de infeções oportunistas, que caso não sejam prevenidas e controladas, podem, em última instância, levar à morte [32].

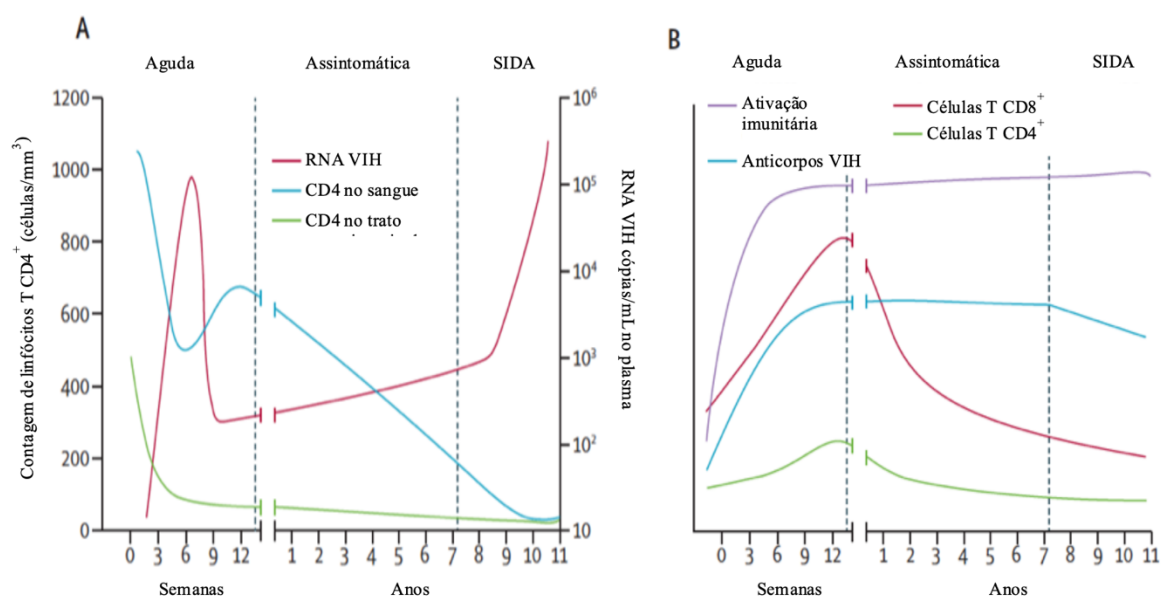


FIGURA 1.6: História natural de uma infecção por VIH (adaptado) [31].

1.6 EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE GENÓTIPOS

O número de mortes por infeção VIH tem decrescido nos últimos anos, sobretudo devido à disponibilidade da terapia antirretrovírica (TAR) na maioria dos países do mundo. Foi observado um decréscimo de 1,9 milhões de mortes em 2004 para 940000 mortes em 2017, verificando-se que esta redução corresponde a sensivelmente metade do número de mortes ^[33].

O VIH-2 comparativamente ao VIH-1 possui um menor potencial de transmissão, sendo a sua distribuição geográfica confinada a uma área restrita da África ocidental ^[34, 35]. De facto, enquanto o VIH-1 provocou uma verdadeira pandemia, disseminando-se por todos os continentes, a infeção por VIH-2 tem distribuição epidémica restrita a países da África Ocidental, particularmente a Guiné-Bissau, Gâmbia, Gana, Senegal e Costa do Marfim, e alguns países europeus com afinidades socioeconómicas com países desta região africana, como são os países de Portugal, França e Holanda ^[36, 37].

Com base na análise filogenética ao genoma do VIH-1, constatou-se que os vírus se distribuem em diferentes grupos, correspondendo a linhagens distintas: grupo M (de *major*), grupo O (*Outlier*), grupo N (não-M e não-O ou *new*), e mais recentemente, o grupo P ^[38]. O grupo M (de *major*) representa os vírus pandémicos distribuídos pelo mundo, podendo estes ainda ser subdivididos em subtipos, geneticamente equidistantes, compreendendo, atualmente, nove subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J e K (**Figura 1.7**); os restantes grupos representam infeções esporádicas, sobretudo ocorrendo na África Central ^[9, 38, 39, 40].

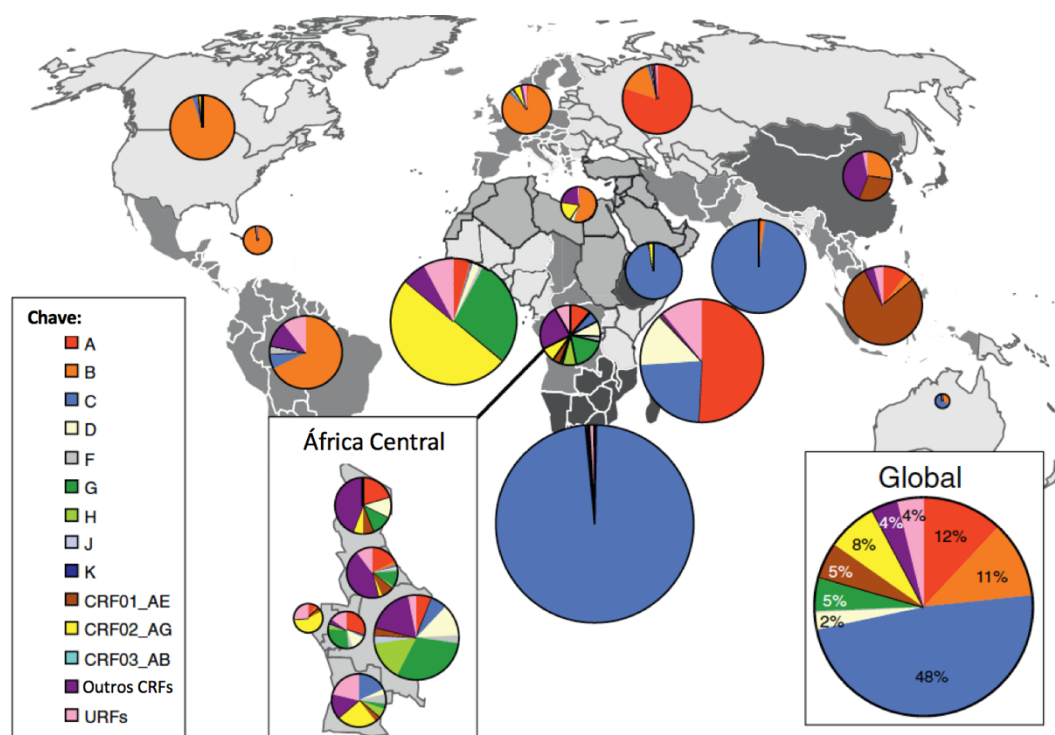


FIGURA 1.7: Distribuição global dos subtipos e recombinantes de VIH-1 (adaptado) ^[9].

Na classificação do VIH-2, a sequenciação dos genes *env*, *pol* e *gag* também revelou a existência de oito grupos diferentes (A a H), anteriormente designados por subtipos. Esta alteração deve-se ao facto de, à semelhança do que acontece com o VIH-1, cada grupo representar uma transmissão independente ao homem, a partir dos primatas não humanos ^[41].

Os avanços registados nas tecnologias de amplificação e sequenciação de ácidos nucleicos têm permitido identificar um número crescente de sequências genómicas de VIH-1 resultantes de recombinação genética entre subtipos virais, sendo designadas de CRF (*circulating recombinant forms*), quando representam estirpes em circulação na população infetada, contribuindo para a pandemia da infeção VIH-1, ou designadas de URF (*unique recombinant forms*), quando são formas únicas isoladas de um único indivíduo ^[42]. Atualmente estão identificadas em todo mundo, 96 CRFs para o VIH-1 e, apenas 1 CRF para VIH-2 ^[43].

Numa escala global, os genótipos de VIH-1 mais prevalentes são os correspondentes ao subtipo C (responsável, a nível mundial, por mais de 50% das infeções), ao subtipo B (globalmente responsável por 11% das infeções), ao subtipo A, e CRF02_AG. Na Europa, o subtipo B do VIH-1 é o tipo de vírus predominante (responsável por 66% das infeções) ^[44]. No entanto, tem-se verificado nos anos recentes um número apreciável e crescente de infeções por subtipos não B. O nosso país exibe, todavia, uma distribuição de tipos e subtipos diferente quando comparada com outros países da Europa. De facto, apresenta uma elevada prevalência de subtipos não B, nomeadamente do subtipo G ^[45]. A elevada frequência deste subtipo, juntamente com a presença do subtipo B na população infetada resultou num recombinante designado de CRF14_BG, que emergiu em Portugal no início dos anos 90 e que se propagou rapidamente, tendo esta variante sido identificada pela primeira vez em Espanha ^[46]. Em 2003, o recombinante CRF14_BG era a forma recombinada mais predominante em Portugal, tendo-se verificado um decréscimo na sua frequência ao longo dos anos, tanto em Portugal como em Espanha ^[47]. Estudos realizados mais recentemente mostraram que um novo recombinante designado de CRF02_AG e amplamente disseminado em África, se apresenta agora como sendo o recombinante mais prevalente em Portugal ^[48]. De referir, ainda, que existe um número considerável de infeções por VIH-2 em circulação na população infetada, devendo-se, em larga parte, à forte ligação histórica que Portugal apresenta com vários países da África Ocidental, onde a infeção por este vírus é endémica ^[49].

O aumento de infeções por subtipos não B não só em Portugal, como também a sua introdução em outros países da Europa reflete o fenómeno de migrações existente por parte de indivíduos que adquiriram a infeção noutros continentes, nomeadamente originários de países com uma diferente epidemiologia da infeção por VIH ^[50, 51, 52].

1.7 VIAS DE TRANSMISSÃO

A atual pandemia da SIDA é o resultado direto da eficácia da transmissão do VIH. Este vírus foi isolado em diferentes líquidos orgânicos, como o sangue, o esperma, as secreções vaginais, o leite materno, a urina, o suor, as lágrimas, a saliva, e também, os líquidos cefalorraquidiano, amniótico e bronco-alveolar ^[53]. Os primeiros estudos epidemiológicos realizados em 1981 nos Estados Unidos da América revelaram que a transmissão do VIH ocorreu maioritariamente através de contacto sexual ou de sangue contaminado ^[54]. Posteriormente foi verificado que mães infetadas com VIH tinham um grande risco de transmitir o vírus aos seus filhos ^[55].

1.7.1 TRANSMISSÃO MÃE-FILHO DO VIH

A transmissão mãe-filho é a principal causa de infeção de VIH em crianças. Desde o início da epidemia, e em menos de uma década, a SIDA constituiu uma das maiores causas de morte em mulheres com menos de 45 anos de idade e em crianças, entre o primeiro e quinto ano de vida. No entanto, o número de mortes relacionadas com SIDA em crianças com menos de 15 anos tem vindo progressivamente a diminuir (estimou-se que ocorreram 210000 mortes em 2010 e 120000 mortes em 2016) ^[33]. Apesar do tratamento estar disponível nos países desenvolvidos, apenas metade de todas as crianças de idade inferior a 15 anos no mundo foram tratadas, muito devido à difícil disponibilidade de fármacos em algumas zonas do mundo ^[33].

Na ausência de qualquer medida de prevenção, o risco de transmissão do VIH a uma criança nascida de mãe infetada, pode rondar os 15-25%, nos países industrializados e 25-35% nos países em desenvolvimento. Estas diferenças podem dever-se à frequência e duração do período de amamentação. A transmissão do VIH pode ocorrer no útero, principalmente no último trimestre de gestação ^[53], pela exposição do feto às células infetadas no líquido amniótico ou placenta, e também durante o parto, após rutura das membranas ou como resultado de microtransfusões de sangue entre o sangue materno e fetal ^[56]. A transmissão pode ocorrer ainda durante a fase de expulsão, ou, inclusivamente, após o nascimento, durante o período de amamentação, sendo o risco tanto maior quanto mais prolongado for o tempo de aleitamento materno ^[53, 57, 58]. A transmissão mãe-filho pode ocorrer pelos dois tipos virais de VIH, contudo, a transmissão do VIH-2 é um acontecimento mais raro, quando comparado com o VIH-1 ^[59]. O risco de transmissão VIH pode ser aumentado por diversos fatores, tais como: fatores imunológicos e genéticos maternos, obstétricos, baixo peso e prematuridade do recém-nascido, socioculturais ligados à amamentação, ou ainda, fatores víricos ^[60].

1.7.1.1 DIAGNÓSTICO PRECOCE EM RECÉM-NASCIDOS

O diagnóstico precoce da infeção primária pelo VIH é fundamental para iniciar uma intervenção terapêutica que conduza a uma maior eficácia na preservação da imunidade e menor taxa de progressão para a doença ^[61].

Para a realização de diagnóstico da infeção pelo VIH existem dois tipos de métodos: os métodos indiretos e os métodos diretos. Os métodos indiretos detetam a presença de anticorpos específicos para antígenos virais, anticorpo IgG, fazendo parte deste grupo os testes de rastreio de 4ª geração e testes confirmatórios com identificação de um perfil de diferentes proteínas virais ^[61, 62].

A infeção pode ser diagnosticada por meio da deteção direta de componentes do vírus, como o antígeno p24 ou com testes moleculares (TM) que detetam RNA ou DNA proviral. Estes testes moleculares apresentam-se essenciais para diagnóstico em crianças com idade inferior a 15-18 meses e em adultos com infeção recente ^[62]. O anticorpo IgG, o antígeno p24 e o RNA viral são considerados marcadores laboratoriais importantes para o diagnóstico do VIH, sendo produzidos no organismo de acordo com o tempo de infeção (**Figura 1.8**).

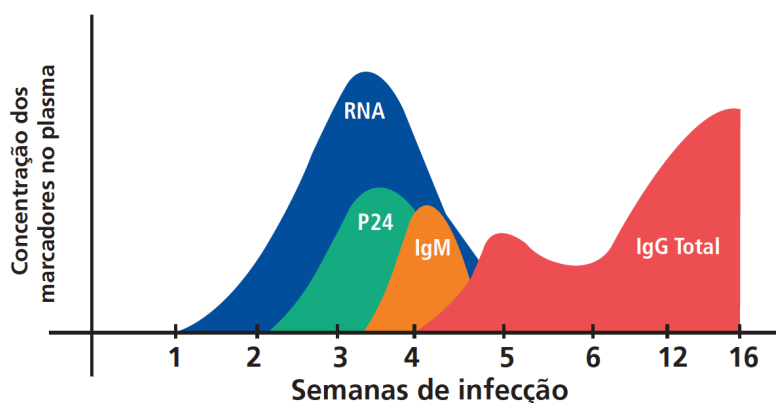


FIGURA 1.8: Marcadores de infecção do VIH ^[62].

Como as crianças recebem passivamente os anticorpos anti-VIH da mãe infetada, a sua pesquisa dos mesmos não permite o diagnóstico no recém-nascido, sendo os testes moleculares os mais eficazes para o diagnóstico em recém-nascidos ^[61]. Os métodos imunoenzimáticos usados na pesquisa de anticorpos só são utilizados após os 15-18 meses de idade da criança, altura em que ocorre a perda dos anticorpos anti-VIH maternos ^[49, 63, 64].

O diagnóstico de infeção VIH é estabelecido com base no resultado positivo de dois testes virológicos efetuados em duas amostras diferentes. O primeiro teste de deteção de DNA proviral ao recém-nascido filho de mãe infetada por VIH é habitualmente realizado nas primeiras 48 horas de vida, o segundo teste, realizado às 6 semanas de vida (duas semanas após terminar a profilaxia por antirretrovirais de prevenção), e posteriormente, aos 4 meses de idade. Por outro lado, a exclusão de infeção por VIH num recém-nascido não amamentado é estabelecida quando se obtêm dois resultados negativos, sendo um teste realizado com mais de 1 mês de idade e outro com 4 ou mais meses de idade. Para os casos em que se verificou aleitamento materno, só se pode excluir a infeção perante dois testes virológicos negativos realizados 2 a 6 semanas após a suspensão da amamentação ^[65].

1.7.1.2 TAR DE PREVENÇÃO E SUA INFLUÊNCIA NAS TAXAS DE TRANSMISSÃO

A TMF do VIH corresponde a mais de 90% das infeções do VIH em crianças e recém-nascidos, tendo sido feito um esforço, em larga escala, para a redução desta via de transmissão ^[66]. Um estudo denominado PACTG 076 (*Pediatric AIDS Clinical Trials Group*) que ocorreu nos Estados Unidos da América e em França marcou o início de uma nova era para a eliminação desta via de transmissão. Neste estudo, foi revelada uma redução em cerca de 66% da taxa de transmissão materna do VIH-1, após a administração do fármaco zidovudina (AZT) à grávida infetada, no último trimestre de gravidez e administrado também ao recém-nascido, nas primeiras 6 semanas de vida ^[67].

Foi mais tarde sugerido que a redução da taxa de transmissão materna do VIH-1, através da administração de AZT durante a gravidez e no momento do parto pode dever-se também ao efeito profilático que o fármaco tem no recém-nascido, para além do decréscimo de carga viral da mãe ^[68].

Em 2002, um estudo constatou que as grávidas que realizaram monoterapia com AZT tinham uma taxa de transmissão do vírus de 10,4%, ao passo que as grávidas que realizaram terapia dupla (dois inibidores da transcriptase reversa (ITR)) tiveram uma taxa de transmissão de 3,8%. Foi ainda revelado no mesmo estudo que as grávidas que cumpriram terapia antirretrovírica de alta eficácia (HAART), combinando dois ITR e um inibidor da protease (IP), tiveram uma taxa de transmissão de 1,2%, demonstrando a eficácia deste regime na diminuição dos níveis de carga viral e consequente redução na taxa de transmissão ^[69].

Atualmente existem diferentes antirretrovirais no mercado distribuídos em várias classes, cuja designação está associada ao seu modo de ação: inibidores nucleosídeos ou não nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR e INNTR), inibidores da protease (IP), inibidores da integrase (IIN), e os inibidores de fusão e de entrada do vírus na célula. Existem também disponíveis formulações constituídas por dois ou mais fármacos da mesma ou de várias classes num único comprimido ^[22].

A classe dos INTR incluem o AZT e constituem a primeira classe de antirretrovirais usados para o tratamento da infeção por VIH. Como a sua designação indica, apresentam-se como inibidores da enzima responsável pela transcrição reversa de RNA viral em DNA. Estes inibidores incorporam-se na cadeia de DNA resultando na sua terminação ^[70, 71]. Por outro lado, a classe dos INNTR ligam-se diretamente ao centro ativo da enzima RT, inibindo a sua função. Estes últimos fármacos apresentam um tempo de semivida longo, permitindo uma administração menos frequente ^[71]. A classe dos IP, bloqueiam a atividade da enzima protease, utilizada na clivagem de poliproteínas necessárias à replicação viral e formação de novas partículas virais infecciosas. A classe dos IIN têm o papel de inibir a ação da integrase, impedindo a integração do provírus de cadeia dupla de DNA no genoma da célula hospedeira ^[70, 71]. Por último, as classes dos inibidores de entrada e de fusão, ainda pouco usados no tratamento, previnem a entrada do virião nas células CD4 do hospedeiro ^[22, 70, 71].

O esquema preferencial de terapia antirretrovírica (TAR) de prevenção para TMF do VIH, atualmente recomendado, deve conter 2 INTR e 1 IP potenciado (por exemplo, AZT + lamivudina (3TC) + lopinavir/ritonavir (LPVr). Existe ainda esquemas iniciais de tratamento baseados em INNTR que possuem eficácia prolongada, embora seja necessário ter em conta a sua baixa barreira genética e o consequente risco de aparecimento de mutações de resistência primária ^[65]. A partir de 2015, o início de TAR em grávidas infetadas começou a ser administrada logo após o diagnóstico de infeção, e independentemente da contagem de células T CD4⁺ ^[72].

Desde 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda para crianças infetadas a administração de regimes terapêuticos o mais precocemente possível, sendo apresentadas diferentes soluções consoante a idade das crianças: para idades inferiores a 3 anos, o esquema baseia-se em dois INTR e um IP potenciado (por exemplo, AZT + 3TC + LPVr); entre os 3 e os 10 anos, regimes com dois INTR e um INNTR (por exemplo, abacavir (ABC) + 3TC + efavirenze (EFV)) para crianças com idades superiores a 10 anos, dois INTR e um INNTR (por exemplo, tenofovir disoproxil fumarato (TDF) + emtricitabina (FTC) + EFV) ^[65, 72]. Em 2006, as recomendações da OMS passavam pela administração de dois INTR e um INNTR (por exemplo, AZT + 3TC + NVP), independentemente da idade da criança ^[72]. É importante, no entanto, salientar que todos os esquemas terapêuticos devem ser individualizados consoante o estado clínico e imunológico de cada indivíduo, as doses ajustadas de modo a garantir uma supressão virológica sustentada e de longa duração ^[65].

Em 2015, a OMS estimou que cerca de 46% das pessoas infetadas com VIH no mundo receberam tratamento antirretrovírico, das quais 872500 eram crianças, maioritariamente a viver em África ^[73] (**Figura 1.9**). Em 2016, cerca de 76% de todas as mulheres grávidas infetadas receberam fármacos para a prevenção da transmissão do VIH aos seus filhos. O esforço global na implementação de medidas de TAR de prevenção durante a gravidez tem conduzido ao decréscimo do número de crianças infetadas no mundo. De facto, de 2013 para 2015, observou-se uma redução de 3,2 milhões para 1,8 milhões de crianças e adolescentes infetados por VIH ^[73].

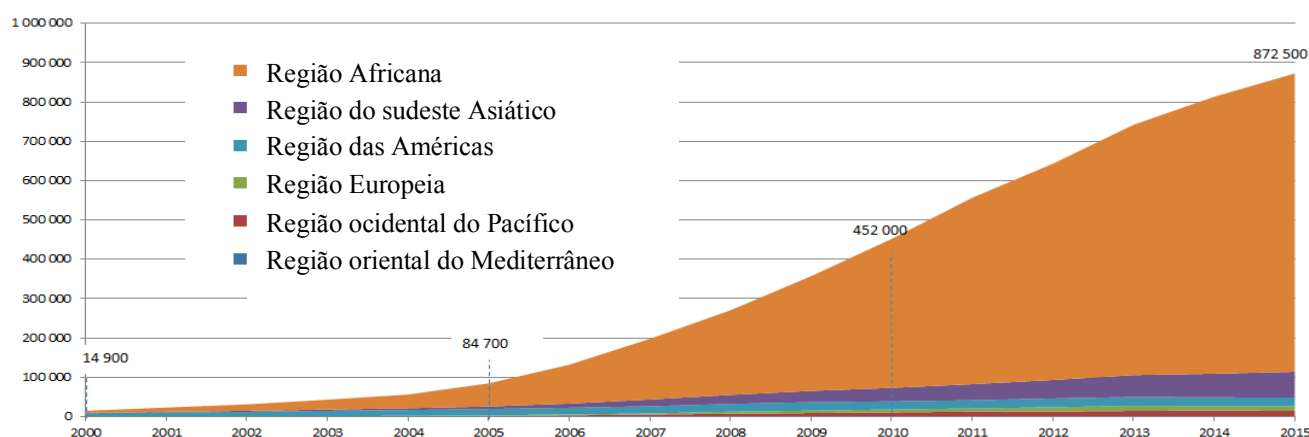


FIGURA 1.9: Número de crianças e adolescentes (< 15 anos) a receberem tratamento antirretrovírico em todo o mundo. Dados da OMS, 2000-2015 ^[73].

A disponibilidade de antirretrovíricos tem aumentado substancialmente a nível global, havendo ainda, algumas dificuldades de acesso, consoante a região do mundo. A inclusão e combinação de novos fármacos nos regimes terapêuticos e de prevenção, bem com a progressiva disponibilidade e diversidade dos mesmos têm conduzido a um decréscimo acentuado das taxas de TMF do VIH, atingindo valores inferiores a 2% em diferentes países, nomeadamente na Tailândia, Brasil, Espanha e Reino Unido ^[74, 75, 76, 77].

Em 1996, antes da implementação das medidas de prevenção da TMF do VIH, Portugal apresentava uma taxa de transmissão mãe-filho de VIH superior a 20% ^[49]. Com o início da TAR de prevenção na grávida e recém-nascido, verificou-se uma redução acentuada da taxa de transmissão mãe-filho, para valores de 7% observados em 1999, atingindo um valor de 0,5% em 2005 ^[49]. Estes resultados parecem aproximar-se das metas propostas pela OMS que recomenda o desenvolvimento de uma estratégia concertada para a eliminação da via de transmissão mãe-filho num futuro próximo.

Apesar do tratamento da infeção VIH/SIDA ser considerado um dos maiores sucessos médicos no final do século XX, a sua eficácia apresenta-se ainda limitada. Os diferentes regimes TAR utilizados não permitem eliminar o vírus do hospedeiro, atendendo a que os fármacos não conseguem alcançar os reservatórios virais no organismo (por exemplo, nódulos linfáticos). Para além disto, o tratamento quando iniciado requer uma adesão vitalícia do indivíduo, não podendo ser descartado os possíveis efeitos de toxicidade a curto ou longo prazo dos antirretrovirais administrados durante a vida ^[78].

Contudo, a adesão à terapia antirretrovírica não é a única medida de prevenção da TMF do VIH. Os testes universais pré-natais de VIH, a monitorização da infeção, a educação nutricional, o parto por cesariana eletiva ou a privação da alimentação do recém-nascido por leite materno ^[60, 76, 77, 79, 80, 81, 82], podem contribuir para a redução das taxas de TMF do VIH.

1.7.1.3 PAPEL DAS RESISTÊNCIAS AOS ANTIRRETROVIRAIS

O desenvolvimento de mutações de resistência a antirretrovirais foi reconhecido com um dos maiores desafios no tratamento da infecção VIH/SIDA. Apesar do aumento significativo de opções terapêuticas disponibilizadas nos países desenvolvidos, a emergência de variantes resistentes é algo que atualmente ainda ocorre ^[83]. Vários fatores contribuíram para o desenvolvimento de mutações de resistência, quer inicialmente pela utilização de regimes monoterapêuticos, quer ainda pelos primeiros esquemas HAART pela sua complexidade posológica, pela sua má tolerabilidade ou potência inconsistente ^[84], verificando-se uma elevada prevalência de mutações de resistência no final do século XX e no início do século XXI ^[85, 86, 87]. De facto, um estudo realizado entre 1991 e 2001 permitiu observar um aumento geral na ocorrência de mutações de resistência em mulheres grávidas que realizaram tratamento comparativamente a mulheres que não o realizaram (respetivamente 34% e 18%) ^[88].

O VIH é caracterizado por uma elevada capacidade de mutação e alta taxa de replicação, não possuindo mecanismos de correção de erros durante a sua replicação viral, e neste contexto, só uma elevada adesão às opções consideradas mais eficazes de tratamento da infecção VIH/SIDA permitem atingir uma completa supressão da replicação viral, diminuindo o aparecimento e fixação de mutações de resistência e sua transmissão à descendência ^[89].

A transmissão de vírus com mutações de resistência ocorre principalmente em países em vias de desenvolvimento, onde existe acesso limitado a antirretrovíricos e uma elevada proporção de mulheres infetadas por VIH amamentam os seus filhos por não terem outros recursos disponíveis. Caso o recém-nascido esteja infetado, as quantidades de antirretrovirais que este recebe através da amamentação, por si só, não são suficientes para suprimir a replicação viral, podendo o recém-nascido, nestes casos, adquirir estirpes virais resistentes ^[90, 91, 92].

Os esquemas que utilizam inibidores da RT, nomeadamente dois INTR e um INNTR, apresentam, regra geral, uma posologia mais simples que facilita a adesão ao tratamento. No entanto, é mais frequente o aparecimento de resistências em doentes com insucesso a esquemas baseados neste regime de inibidores da RT, comparativamente aos regimes com dois INTR e um IP potenciado, pelo facto dos últimos oferecerem uma maior barreira genética à resistência. Na prática, a resistência a inibidores da protease surge pela combinação de várias mutações, ao passo que para a classe dos INNTR, apenas uma mutação pode ser suficiente para conferir resistência, por exemplo as mutações L100I ou K101P, conferem resistência ao fármaco efavirenze (EFV) ou à nevirapina (NVP) ^[89]. Mais recentemente, e como alternativa para os esquemas terapêuticos, a classe de fármacos de inibidores da IN começou a ser recomendada para doentes que já tenham sido tratados por antirretrovirais de outras classes e que apresentavam mutações de resistência a vários fármacos ^[89].

De acordo com estudos desenvolvidos na área, diferentes mutações foram associadas à resistência a antirretrovirais, estando estas identificadas para as classes dos ITR (INTR e INNTR), IIN e IP do VIH-1 de acordo com a publicação da IAS-USA de 2017 nas seguintes **Figuras 1.10, 1.11 e 1.12**.

INIBIDORES NUCLEÓSIDOS/NUCLEÓTIDOS DA TRANSCRIPTASE REVERSA (INTR)										
Abacavir	K 65 R E N	L 74 V			Y 115 F			M 184 V		
Didanosina	K 65 R E N	L 74 V								
Emtricitabina	K 65 R E N							M 184 V I		
Lamivudina	K 65 R E N							M 184 V I		
Estavudina	M 41 L	K 65 R E N	D 67 N	K 70 R					L 210 W	T 215 Y
Tenofovir	K 65 R E N			K 70 E						
Zidovudina	M 41 L	D 67 N	K 70 R						L 210 W	T 215 Y
INIBIDORES NÃO NUCLEÓSIDOS DA TRANSCRIPTASE REVERSA (INNTR)										
Efavirenze		L 100 I	K 101 P	K 103 N S	V 106 M	V 108 I		Y 181 C I	Y 188 L	G 190 S A
Etravirina		V 90 I	A 98 G	L 100 I	K 101 E H P	V 106 I	E 138 A G K Q	V 179 D F T	Y 181 C I V	G 190 S A
Nevirapina		L 100 I	K 101 P	K 103 N S	V 106 A M	V 108 I		Y 181 C I	Y 188 C L H	G 190 A
Rilpivirina		L 100 I	K 101 E P				E 138 A G K Q R	V 179 L	Y 181 C I V	Y 188 L
									H 221 Y	F 227 C
										M 230 L

FIGURA 1.10: Lista das principais mutações de resistência às classes INTR e INNTR do VIH-1 (adaptado) ^[93].

INIBIDORES DA INTEGRASE (IIN)										
Dolutegravir ^{aa}				F 121 Y	E 138 A K	G 140 A S		Q 148 H K R	N 155 H	R 263 K
Elvitegravir ^{bb}	T 66 I A K	E 92 Q G	T 97 A	F 121 Y				S 147 G H K R	N 155 H	R 263 K
Raltegravir ^{cc}		L 74 M	E 92 Q	T 97 A	F 121 Y	E 138 A K	G 140 A S	Y 143 R H C	Q 148 H K R	N 155 H
										R 263 K

FIGURA 1.11: Lista das principais mutações de resistência à classe IIN do VIH-1 (adaptado) ^[93].

INIBIDORES DA PROTEASE (IP)

Atazanavir +/- ritonavir ^a	L 10 I F V C	G 16 E	K 20 R	L 24 I T V	V 32 I	L 33 F	E 34 Q V	M 36 I L V	M 46 I L	G 48 V	I 50 L	F 53 L Y	I 54 L V M T A	D 60 E	I 62 V	I 64 L M V	A 71 V C S T T A	G 73 V C S T A	V 82 A T F I	I 84 V	I 85 V	N 88 S	L 90 M	I 93 L M
	V 11 I				V 32 I	L 33 F			I 47 V		I 50 V	I 54 M L					T 74 P	L 76 V		I 84 V		L 89 V		
	L 10 F I R V				V 32 I				M 46 I L	I 47 V	I 50 V	I 54 L V M					G 73 S	L 76 V	V 82 A F S T	I 84 V		L 90 M		
	L 10 I R V		K 20 M R	L 24 I	V 32 I			M 36 I	M 46 I L			I 54 V					A 71 V T	G 73 S A	L 76 V I	V 82 A F T	I 84 V		L 90 M	
Lopinavir/ ritonavir ^a	L 10 F I R V	K 20 M R	L 24 I	V 32 I	L 33 F				M 46 I L	I 47 V	I 50 V	F 53 L	I 54 V L A M T S			L 63 P	A 71 V T	G 73 S	L 76 V	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
	L 10 F I R V				V 32 I	L 33 F			M 46 I L	I 47 V	I 50 V	F 53 L	I 54 V L A M T S			L 63 P	A 71 V T	G 73 S	L 76 V	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
	L 10 F I R V	K 20 M R	L 24 I	V 32 I	L 33 F				M 46 I L	I 47 V	I 50 V	F 53 L	I 54 V L A M T S			L 63 P	A 71 V T	G 73 S	L 76 V	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
	L 10 F I R V	K 20 M R	L 24 I	V 32 I	L 33 F				M 46 I L	I 47 V	I 50 V	F 53 L	I 54 V L A M T S			L 63 P	A 71 V T	G 73 S	L 76 V	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
Nelfinavir ^{u,w}	L 10 F I			D 30 N				M 36 I	M 46 I L								A 71 V T		V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V	N 88 D S	L 90 M	
	L 10 F I			D 30 N				M 36 I	M 46 I L								A 71 V T		V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V	N 88 D S	L 90 M	
	L 10 F I			D 30 N				M 36 I	M 46 I L								A 71 V T		V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V	N 88 D S	L 90 M	
	L 10 F I			D 30 N				M 36 I	M 46 I L								A 71 V T		V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V	N 88 D S	L 90 M	
Saquinavir/ ritonavir ^u	L 10 I R V			L 24 I					G 48 V		I 54 V L			I 62 V			A 71 V T	G 73 S	V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
	L 10 I R V			L 24 I					G 48 V		I 54 V L			I 62 V			A 71 V T	G 73 S	V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
	L 10 I R V			L 24 I					G 48 V		I 54 V L			I 62 V			A 71 V T	G 73 S	V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
	L 10 I R V			L 24 I					G 48 V		I 54 V L			I 62 V			A 71 V T	G 73 S	V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V		L 90 M	
Tipranavir/ ritonavir	L 10 V				L 33 F			M 36 I L V	K 43 T	M 46 L	I 47 V	I 54 A M V	Q 58 E				H 69 K R	T 74 P	V 82 L T	N 83 D	I 84 V		L 89 I M V	
	L 10 V				L 33 F			M 36 I L V	K 43 T	M 46 L	I 47 V	I 54 A M V	Q 58 E				H 69 K R	T 74 P	V 82 L T	N 83 D	I 84 V		L 89 I M V	
	L 10 V				L 33 F			M 36 I L V	K 43 T	M 46 L	I 47 V	I 54 A M V	Q 58 E				H 69 K R	T 74 P	V 82 L T	N 83 D	I 84 V		L 89 I M V	
	L 10 V				L 33 F			M 36 I L V	K 43 T	M 46 L	I 47 V	I 54 A M V	Q 58 E				H 69 K R	T 74 P	V 82 L T	N 83 D	I 84 V		L 89 I M V	

FIGURA 1.12: Lista das principais mutações de resistência à classe IP do VIH-1 (adaptado) ^[93].

II. OBJETIVOS

O Laboratório Nacional de Referência no INSA tem desenvolvido estudos na área da transmissão do VIH-1 e VIH-2, tendo como suporte um protocolo laboratorial implementado a nível nacional para diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho destes dois tipos de vírus. Estudos de vigilância epidemiológica têm sido realizados para determinar as taxas anuais de transmissão VIH e avaliar os principais fatores que influenciam a transmissão do VIH à criança. No entanto, passados dez anos da última avaliação realizada, torna-se agora essencial fazer uma nova análise evolutiva da situação e verificar o impacto das alterações nas medidas de prevenção da TMF do VIH que ocorreram ao longo deste período de tempo.

A conceção do estudo e o seu desenvolvimento atendeu a duas propostas de trabalho: uma abordagem prospetiva (presente-futuro) que decorreu no período efetivo em que foram rececionadas as amostras no laboratório, concretamente entre outubro de 2017 a março de 2018 (seis meses), e uma abordagem retrospectiva em que foram analisados os dados registados numa base de dados anonimizada do laboratório, correspondentes a amostras processadas entre 2006 a 2016. Estas abordagens apresentam objetivos semelhantes e foram delineadas no contexto de contribuir para melhorar o conhecimento sobre a evolução da situação nacional na área de transmissão mãe-filho do VIH-1 e VIH-2.

Atendendo ao enquadramento e aos fatores acima descritos, os objetivos gerais do presente estudo foram os seguintes:

1. Nas amostras rececionadas no laboratório, entre outubro 2017 e março de 2018, realizar o diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho do VIH-1 e do VIH-2 utilizando o algoritmo laboratorial estabelecido;
2. Nas amostras positivas identificadas no período de tempo de seis meses (amostras de crianças verticalmente infetadas e respetivas mães), realizar a caracterização do VIH através da análise molecular de diferentes regiões do genoma;
3. Para o período de tempo acima referido, caracterizar o total das amostras processadas tendo por base a informação epidemiológica e clínica recolhida através do inquérito que acompanhou o envio das amostras ao laboratório;
4. Determinar as taxas de transmissão mãe-filho do VIH-1 e VIH-2 entre outubro 2017 e março de 2018 em função do cumprimento dos regimes terapêuticos de prevenção administrados na grávida e recém-nascido;
5. Entre 2006 e 2016, realizar a análise da evolução das taxas anuais da transmissão mãe-filho VIH-1 e VIH-2, bem como caracterizar a população estudada, atendendo a fatores demográficos, epidemiológicos e clínicos conhecidos;
6. Para o período de 11 anos, acima referido, pretendeu-se ainda analisar os casos de transmissão mãe-filho do VIH-1 e VIH-2, em função do cumprimento e alteração dos regimes terapêuticos de prevenção administrados na grávida e recém-nascido, bem como avaliar outros indicadores conhecidos que possam influenciar a transmissão do VIH da mãe ao filho.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRAS ANALISADAS E RECOLHA DE DADOS

O diagnóstico precoce da infecção VIH-1 e/ou VIH-2 em amostras de crianças nascidas de mães infetadas foi realizado através da técnica de *nested* PCR usando *primers* específicos para o tipo de vírus em causa, sendo este previamente identificado através do estudo de uma amostra materna. O seguimento laboratorial da criança incluiu o processamento de amostras sequenciais no tempo, a primeira das quais colhida até às 48 horas de vida do recém-nascido. A colheita de sangue materno para controlo do desempenho dos *primers* usados na amplificação de VIH foi realizada aquando da primeira colheita de sangue ao recém-nascido, ou seja, próximo à data do parto.

A metodologia implementada no laboratório de referência para o diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho do VIH foi executada para o total das amostras recebidas no laboratório entre outubro de 2017 e março de 2018 (seis meses), seguindo o algoritmo laboratorial estabelecido (**Figura 3.1**), sendo também realizada a análise das principais características epidemiológicas e clínicas associadas, feita a caracterização das amostras positivas diagnosticadas no período de tempo referido, tendo por base uma análise molecular alargada a diferentes regiões do genoma, nomeadamente *gag*, *pol*, *env* e *nef* do VIH.

Partindo da base de dados do laboratório contendo informação sobre as amostras analisadas de crianças com diagnóstico de infecção VIH estabelecido (negativo ou positivo) entre os anos de 2006 a 2016, foi realizada uma análise retrospectiva detalhada dos dados, utilizando o programa Epi Info™. Neste enquadramento, foi necessário realizar previamente, uma adequação dos ficheiros de dados do laboratório a um novo formato, compatível à migração de dados para Epi Info™ e desta forma, possibilitar o respetivo tratamento estatístico dos dados. Esta análise permite contribuir para melhorar o conhecimento sobre a evolução das taxas de transmissão mãe-filho do VIH-1 e VIH-2 ao longo dos últimos anos, analisar os fatores que influenciaram a ocorrência da transmissão e o impacto das alterações nos regimes terapêuticos de prevenção administrados durante a gravidez no período de tempo acima referido.

Os dados em análise da população em estudo incluem os dados demográficos das mães (naturalidade, idade), os dados clínicos relativos ao tipo de vírus materno, aos níveis de carga viral (população VIH-1) e de células T CD4⁺ próximos à data do parto, tempo de infecção, bem como informação sobre o regime específico de TAR seguido durante a gravidez e administrado ao recém-nascido, para prevenção da transmissão mãe-filho do VIH.

Estes dados analisados foram originalmente recolhidos de uma folha de inquérito que acompanhou cada amostra de sangue enviada ao laboratório, dos vários hospitais e maternidades (instituições de saúde) no contexto do diagnóstico da TMF do VIH. Os dados da folha de inquérito incluem as determinações dos níveis de carga viral (população VIH-1) e do número de células T CD4⁺ próximos à data do parto, que foram efetuadas através dos métodos comerciais implementados nas respetivas instituições de saúde.

Os principais critérios utilizados no estudo foram: a TAR de prevenção cumprida se iniciada até às 12 semanas de gravidez, incluindo a administração da profilaxia na criança; os casos de início tardio (final da gravidez) ou toma irregular foram considerados de casos em que não ocorreu cumprimento TAR de prevenção. O diagnóstico da TMF do VIH foi considerado concluído se ocorreu seguimento laboratorial da criança com envio ao laboratório de amostras de sangue colhidos sequencialmente no tempo, sendo a última colheita efetuada à criança com mais de 120 dias de vida; na determinação das taxas anuais de transmissão mãe-filho do VIH atendeu-se apenas aos casos de crianças com diagnóstico concluído, sendo que o cálculo foi efetuado em função do ano de nascimento da criança.

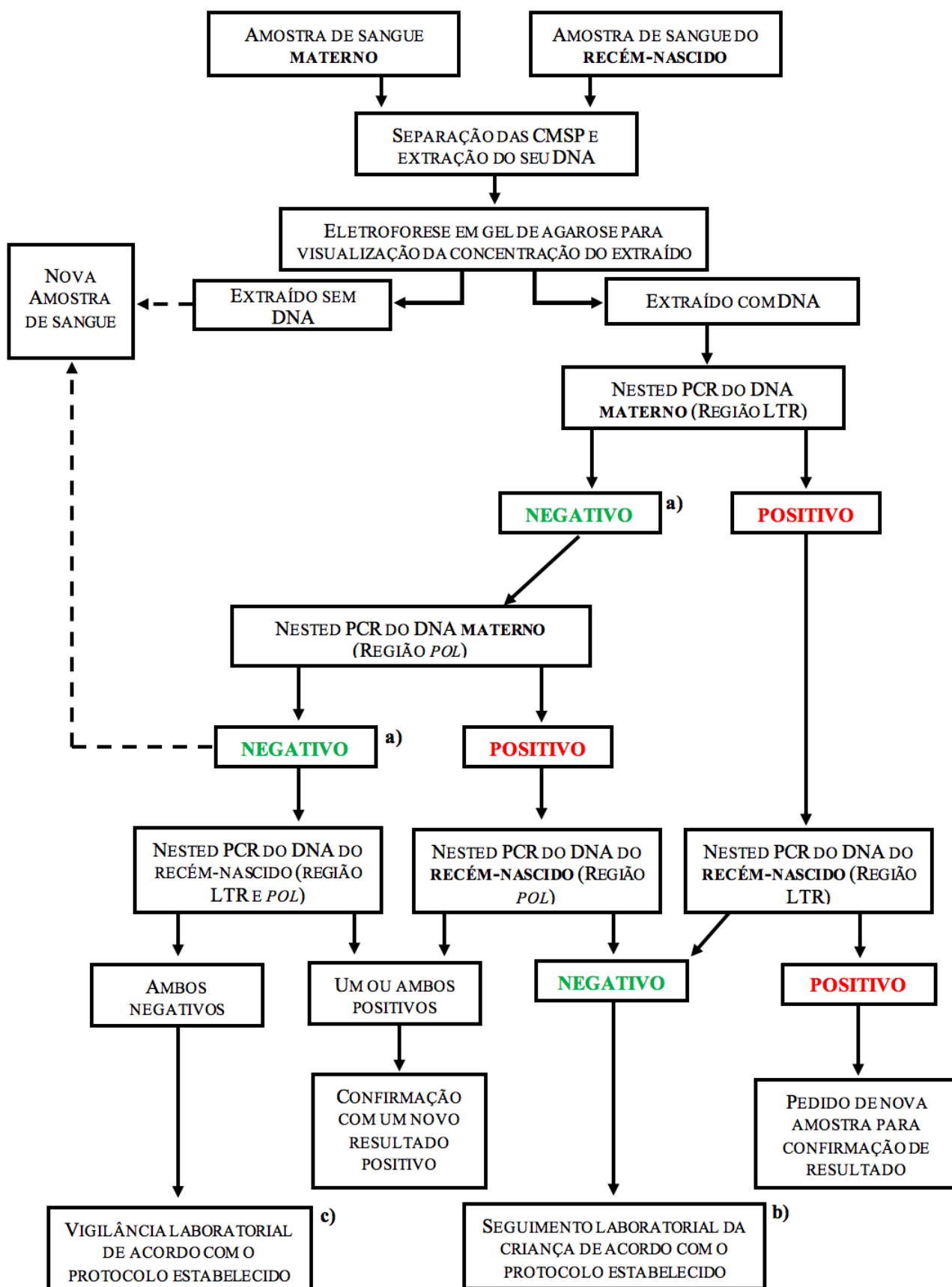


Figura 3.1: Algoritmo laboratorial para diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho do VIH ^[49].

^{a)} Sem amplificação do DNA proviral; ^{b)} até aos 6 meses de idade; ^{c)} até aos 12-15 meses de idade.

2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS NO LABORATÓRIO

2.1 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO

As colheitas de sangue materno e do recém-nascido foram efetuadas para tubos contendo anticoagulante EDTA. Após a chegada das amostras ao laboratório, realizou-se a separação de células mononucleadas do sangue periférico (CMSP).

Para tal, o sangue foi transferido para tubos de centrífuga de 15 mL, devidamente identificados, com posterior centrifugação a 2500 rpm, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Após centrifugação, transferiu-se o plasma para tubos de 1,5 mL com rosca para sua conservação a menos 80°C até utilização. Ao restante sangue foi adicionado, igual volume de tampão PBS (Phosphate-buffered saline) (*Lonza, Verviers, Belgium*) e homogeneizado por inversão. Este sangue diluído foi vertido para novos tubos de 15 mL, contendo 3 mL de Ficoll-Paque™ PREMIUM (*GE Healthcare, Uppsala, Sweden*), de forma lenta e cuidadosa contra a parede do tubo, de modo a ficar sobre a camada de Ficoll-Paque™. De seguida, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm, à temperatura ambiente, durante 30 minutos para separação das CMSP. Passado este tempo, retirou-se o anel das CMSP formado, aspirando-o com uma pipeta automática e colocando-o num novo tubo de centrífuga de 15 mL para se iniciar o procedimento de lavagem. A cada tubo, adicionou-se 10 mL de tampão, seguido de uma homogeneização por inversão. Estes novos tubos contendo as células mononucleadas e diluídas no tampão foram centrifugados a 1200 rpm, à temperatura ambiente, durante 1 minutos (1ª lavagem). Terminada a centrifugação, descartou-se o sobrenadante por decantação e adicionou-se 5 mL de tampão PBS, para uma segunda lavagem das células, mantendo as condições anteriormente descritas. Por fim, decantou-se e ressuspendeu-se o *pellet* de células em 400 µL de tampão PBS, sendo transferido para tubos de 1,5 mL de fundo cônico para conservação a menos 80°C até posterior utilização.

2.2 EXTRAÇÃO DO DNA DAS CMSP

O processo de extração de DNA foi realizado pelo método de coluna, com o auxílio do *kit QIAGEN QIAamp® DNA Blood (QIAGEN, Studio City, USA)*.

Para a realização do processo de extração, começou-se por pipetar 20 µL de Proteinase K para tubos de 1,5 mL, com posterior adição de 200 µL de suspensão de CMSP em tampão PBS e de 200 µL de *Buffer AL*. Os tubos foram homogeneizados por agitação no vortex, durante 15 segundos, seguindo-se uma incubação a 56°C, por um período de 10 minutos. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados brevemente sendo adicionados à mistura 200 µL de etanol a 98%, voltando-se a homogeneizar a mistura por agitação no vortex.

Esta mistura foi passada numa coluna, inserida num tubo coletor de 2 mL, através de centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto, descartando-se o tubo contendo o filtrado.

Posteriormente, para a lavagem da coluna foi adicionado 500 µL de tampão AW1 seguindo-se uma centrifugação de 8000 rpm, à temperatura ambiente durante 1 minuto. Após esta centrifugação, colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2 mL, sendo novamente descartado o filtrado. Passando a coluna para novo tubo coletor, foi adicionado 500 µL de tampão AW2, e realizada uma nova centrifugação, desta vez a 14000 rpm, com duração de 3 minutos.

Por fim, a coluna foi colocada num novo tubo coletor de 1,5 mL e adicionou-se 200 µL de tampão de eluição AE, sendo incubada à temperatura ambiente durante 1 minuto, seguindo-se centrifugação a 8000 rpm, durante 1 minuto. O eluído foi congelado a menos 20°C até à sua utilização.

Para observar as condições e a concentrações do DNA extraído das CMSP, procedeu-se à análise de alíquotas dos eluídos em eletroforese de gel de agarose a 1% (30 minutos, a 120 V), visualizadas sob luz ultravioleta, após contrastação com GelRed™ (*Biotium, California, USA*), no sentido de saber o volume de amostra a adicionar na mistura de reação para amplificação do VIH. Amostras de DNA extraído foram adicionadas à mistura de reação e submetidas a amplificação por PCR.

3. AMPLIFICAÇÃO DE DIFERENTES REGIÕES GENÓMICAS DO VIH

Devido ao elevado potencial de ocorrência de contaminações, em todas as reações de amplificação foram usados controlos negativos nas reações de amplificação para ambos os vírus e foram seguidos todos os procedimentos recomendados de modo a evitar contaminações. Diferentes espaços físicos de trabalho foram usados, tendo sido respeitado o fluxo unidirecional do trabalho.

3.1 NO DIAGNÓSTICO DA INFEÇÃO POR VIH

3.1.1 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LTR E *POL* DO VIH-1

Para diagnóstico do VIH-1, todas as amostras foram sujeitas a uma amplificação do VIH pela técnica de *nested* PCR, tendo a região LTR (regiões repetitivas terminais longas) sido amplificada utilizando os *primers* externos (primeira amplificação) e internos (segunda amplificação) descritos por Berry, *et al.*, 1998 ^[94], e a região polimerase (*pol*) amplificada pelos *primers* descritos por Semple, *et al.*, 1991 ^[95].

Para a primeira amplificação da região LTR utilizou-se os *primers* externos HL470N e HL650C (posições 470-491 e 622-650 no isolado HXB2) e para a segunda amplificação, os *primers* internos HL478N e HL602C (posições 478-499 e 578-602 no isolado HXB2). Para a região *pol* utilizou-se os *primers* externos HP3541N e MH6 (posição 3541-3563 e 3770-3793 no isolado HXB2) numa primeira amplificação, ao passo que na segunda amplificação utilizou-se os *primers* internos HP3600N e Pol 2 (posições 3600-3622 e 3722-3743 do isolado HXB2).

Na amplificação de ambas as regiões do VIH-1 (**Tabela 3.1 e 3.2**) a quantidade de DNA adicionado à mistura de reação dependeu sempre da concentração do DNA extraído, sendo adicionando num volume variável entre 5-15 µL.

TABELA 3.1: Mistura de reação usada para amplificação da região LTR do VIH-1.

MISTURA DE REACÇÃO - 1º PCR (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS) REGIÃO LTR DO VIH-1		MISTURA DE REACÇÃO - 2º PCR (<i>PRIMERS</i> INTERNOS) REGIÃO LTR DO VIH-1	
COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 50 µL)	COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 25 µL)
10x PCR BUFFER	5 µL	10x PCR BUFFER	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	2,5 µL	25 mM MgCl ₂	1,25 µL
1,25 mM dNTPs	8 µL	1,25 mM dNTPs	4 µL
10 µM <i>PRIMER</i> HL470N	0,5 µL	10 µM <i>PRIMER</i> HL478N	0,5 µL
10 µM <i>PRIMER</i> HL650C	0,5 µL	10 µM <i>PRIMER</i> HL602C	0,5 µL
H ₂ O	23,25 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	14,125 µL
5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,25 µL	5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,125 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 10 µL		AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

TABELA 3.2: Mistura de reação usada para amplificação da região *pol* do VIH-1.

MISTURA DE REAÇÃO - 1º PCR (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS) REGIÃO <i>POL</i> DO VIH-1		MISTURA DE REAÇÃO - 2º PCR (<i>PRIMERS</i> INTERNOS) REGIÃO <i>POL</i> DO VIH-1	
COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 50 µL)	COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 25 µL)
10x PCR BUFFER	5 µL	10x PCR BUFFER	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	3 µL	25 mM MgCl ₂	1,4 µL
1,25 mM dNTPs	8 µL	1,25 mM dNTPs	4 µL
5 µM <i>PRIMER</i> HP3541N	2 µL	10 µM <i>PRIMER</i> HP3600N	1,25 µL
5 µM <i>PRIMER</i> MH6	2 µL	10 µM <i>PRIMER</i> POL 2	1,25 µL
H ₂ O	19,75 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	14,47 µL
5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,25 µL	5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,13 µL
AMOSTRA (DNA EXTRAÍDO DE CMSP): 10 µL		AMOSTRA (PRODUTO DO 1º PCR): 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

O programa de amplificação, para a região LTR do VIH-1, encontra-se descrito na **Tabela 3.3** e, para a região *pol* de VIH-1, na **Tabela 3.4**.

TABELA 3.3: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região LTR do VIH-1.

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LTR DE VIH-1				
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 9min	X 1	95°C, 9min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s		95°C, 15s	
HIBRIDAÇÃO	50°C, 1min	X 35	50°C, 45s	X 35
SÍNTESE	72°C, 1min		72°C, 45s	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1	72°C, 7min	X 1

TABELA 3.4: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região *pol* do VIH-1.

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>POL</i> DE VIH-1				
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 9min	X 1	95°C, 9min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 1min	X 35	95°C, 45s	X 35
HIBRIDAÇÃO	62°C, 1min		50°C, 1min	
SÍNTESE	72°C, 1min		72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1	72°C, 7min	X 1

3.1.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LTR E *POL* DO VIH-2

Para diagnóstico do VIH-2, as amostras foram submetidas a uma amplificação pela técnica de *nested* PCR. A região LTR e a região *pol* foram amplificadas utilizando os *primers* externos (1ª amplificação) e internos (2ª amplificação) descritos por Berry, *et al.*, 1994 ^[96].

Para a primeira amplificação da região LTR utilizou-se os *primers* externos H2L9411N e H2L9592C (posições 9411-9431 e 9574-9592 no isolado LAV-2 ROD) e para a segunda amplificação, os *primers* internos H2L9432N e H2L9573C (posições 9432-9453 e 9553-9573 no isolado LAV-2 ROD). Para a região *pol* utilizou-se os *primers* externos H2P4283N e H2L9592C (posição 4283-4302 e 4620-4641 no isolado LAV-2 ROD) na primeira amplificação, ao passo que na segunda amplificação utilizou-se os *primers* internos H2P4298N e H2P4609C (posições 4298-4317 e 4589-4609 do isolado LAV-2 ROD).

As misturas de reação para ambas as regiões do VIH-2 encontram-se descritas nas Tabelas 3.5 e 3.6.

TABELA 3.5: Mistura de reação usada para amplificação da região LTR do VIH-2.

MISTURA DE REAÇÃO - 1º PCR (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS) REGIÃO LTR DO VIH-2		MISTURA DE REAÇÃO - 2º PCR (<i>PRIMERS</i> INTERNOS) REGIÃO LTR DO VIH-2	
COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 50 µL)	COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 25 µL)
10x PCR BUFFER	5 µL	10x PCR BUFFER	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL	25 mM MgCl ₂	1,75 µL
1,25 mM dNTPs	8 µL	1,25 mM dNTPs	4 µL
5 µM <i>PRIMER</i> H2L9411N	2 µL	5 µM <i>PRIMER</i> H2L9432N	0,5 µL
5 µM <i>PRIMER</i> H2L9592C	2 µL	5 µM <i>PRIMER</i> H2L9573C	0,5 µL
H ₂ O	20,75 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	12,125 µL
5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,25 µL	5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,1 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 10 µL		AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

TABELA 3.6: Mistura de reação usada para amplificação da região *pol* do VIH-2.

MISTURA DE REACÇÃO - 1º PCR (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS) REGIÃO <i>POL</i> DO VIH-2		MISTURA DE REACÇÃO - 2º PCR (<i>PRIMERS</i> INTERNOS) REGIÃO <i>POL</i> DO VIH-2	
COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 50 µL)	COMPONENTES	VOLUME (TOTAL 25 µL)
10x PCR BUFFER	2,5 µL	10x PCR BUFFER	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL	25 mM MgCl ₂	2 µL
1,25 mM dNTPs	4 µL	1,25 mM dNTPs	4 µL
5 µM <i>PRIMER</i> H2P4283N	1 µL	5 µM <i>PRIMER</i> H2P4298N	1 µL
5 µM <i>PRIMER</i> H2P4641C	1 µL	5 µM <i>PRIMER</i> H2P4609C	1 µL
H ₂ O	29,375 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	12,375 µL
5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,125 µL	5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,125 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 10 µL		AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reacção e depende do volume de amostra adicionada.

Os programas de amplificação de VIH-2, para as duas regiões mencionadas, encontram-se descritos na **Tabela 3.7** e **Tabela 3.8**.

TABELA 3.7: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região LTR do VIH-2.

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LTR DE VIH-2				
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 9min	X 1	95°C, 9min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 45s		95°C, 45s	
HIBRIDAÇÃO	53°C, 45s	X 35	50°C, 45s	X 35
SÍNTESE	72°C, 45s		72°C, 45s	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1	72°C, 7min	X 1

TABELA 3.8: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região *pol* do VIH-2.

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>POL</i> DE VIH-2				
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 9min	X 1	95°C, 9min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 1min	X 35	95°C, 1min	X 35
HIBRIDAÇÃO	55°C, 1min		50°C, 1min	
SÍNTESE	72°C, 1min		72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1	72°C, 7min	X 1

3.2 REGIÕES *GAG*, *POL*, *ENV* E *NEF* PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIH-1

Nas amostras positivas, diagnosticadas entre outubro de 2017 e março de 2018, a que correspondem as amostras de crianças verticalmente infetadas e respetivas mães, foi realizada a análise molecular de diferentes regiões do genoma do VIH, nomeadamente *gag*, *pol*, *env* e *nef*, no sentido de classificar o vírus em causa.

3.2.1 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO *GAG* DO VIH-1

A região do gene *gag* foi amplificada pela técnica de *nested* PCR utilizando os *primers* descritos por Heyndrickx *et al.*, 2000 ^[97]. Numa primeira amplificação utilizou-se o sistema *PuReTaq Ready-to-go™ PCR Beads* (GE Healthcare, England) e os *primers* externos H1G777 e H1P202 (posições 1231-1255 e 2328-2352 no isolado HXB2). A segunda amplificação foi realizada com a enzima *AmpliTaq Gold®* (Applied Biosystems, Foster City, USA) e em duas diferentes combinações de pares de *primers* internos. Numa primeira opção, utilizou-se o par de *primers* H1G822 e H1GHMA1317 (posições 1276-1298 e 2078-2103 no isolado HXB2) e numa segunda opção o par de *primers* H1Gag1584 e g17 (posições 1577-1595 e 2017-2040 no isolado HXB2).

A mistura de reação e o programa de amplificação utilizados na amplificação da região *gag* do VIH-1 encontram-se descritos na Tabela 3.9 e Tabela 3.10.

TABELA 3.9: Mistura de reação usada para a primeira (A) e segunda (B) amplificação da região *gag* do VIH-1.

A)		B)	
MISTURA DE REAÇÃO COM READY-TO-GO™ PCR BEADS		MISTURA DE REAÇÃO COM AMPLITAQ GOLD®	
1° PCR <i>GAG</i> (PRIMERS EXTERNOS)		2° PCR <i>GAG</i> (PRIMERS INTERNOS)	
PCR BEADS	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)	MISTURAS DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 50 µL)
10 µM PRIMER H1G777	1 µL	10X PCR BUFFER	5 µL
10 µM PRIMER H1P202	1 µL	25 mM MgCl ₂	3 µL
H ₂ O	17 µL ⁽¹⁾	1,25 mM dNTPs	8 µL
		10 µM PRIMER FORWARD ⁽²⁾	2 µL
		10 µM PRIMER REVERSE ⁽²⁾	2 µL
		H ₂ O	27,75 µL
		5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,25 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 6 µL		AMOSTRA PRODUTO 1° PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

⁽²⁾ *Primer* direto: H1G822 e *primer* reverso: H1GHMA1317 utilizados na 1ª opção; *Primer* direto: H1Gag1584 e o *primer* reverso: g17 utilizadas na 2ª opção.

TABELA 3.10: Programa de amplificação utilizado para a primeira (A) e segunda (B) amplificação da região *gag* do VIH-1.

A)			B)		
PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>GAG</i> DE VIH-1			PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>GAG</i> DE VIH-1		
ETAPAS	1° PCR	N° DE CICLOS	ETAPAS	2° PCR	N° DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	94°C, 9min	X 1	DESNATURAÇÃO INICIAL	94°C, 9min	X 1
DESNATURAÇÃO	94°C, 30s	X 40	DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 3
HIBRIDAÇÃO	50°C, 30s		HIBRIDAÇÃO	37°C, 45s	
SÍNTESE	68°C, 1min e 30s		SÍNTESE	72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	68°C, 7min	X 1	DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 35
			HIBRIDAÇÃO	50°C, 45s	
			SÍNTESE	72°C, 1min	
			EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1

3.2.2 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE *POL* (PR E RT) DO VIH-1

A região do gene *pol* que codifica para a PR e RT foi amplificada utilizando a enzima *BIO-X-ACT™ DNA Polymerase* (Bioline, London, England), e quatro *primers* descritos por Steegan *et al.*, 2006^[98] e Videira e Castro, 2010^[99] - Gag2, PR1, RT137 e RT3303 (posições 1404-1426, 1822-1844, 3301-3325 e 3309-3329 no isolado HXB2) numa primeira reação de amplificação. A segunda amplificação foi realizada com a mesma enzima, tendo sido utilizado separadamente os pares de *primers* PR3 e PR4 (posições 2146-2166 e 2584-2605 no isolado HXB2) para amplificação da protease e os *primers* RT1 e RT4 (posições 2604-2632 e 3231-3253 no isolado HXB2) para amplificação da região RT.

As misturas de reação e os programas de amplificação para a região da protease encontram-se descritos na **Tabela 3.11** e **Tabela 3.12**.

TABELA 3.11: Mistura de reação usada para a primeira amplificação da região *pol* (PR) do VIH-1.

MISTURA DE REAÇÃO COM <i>BIO-X-ACT™ DNA POLYMERASE</i>			
1º PCR <i>POL</i> (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS)		2º PCR PR (<i>PRIMERS</i> INTERNOS)	
MISTURA DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)	MISTURAS DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)
10X OPTIBUFFER	2,5 µL	10X OPTIBUFFER	5 µL
50 mM MgCl ₂	1 µL	50 mM MgCl ₂	2 µL
100 mM dNTPs	0,5 µL	100 mM dNTPs	1 µL
100 µM <i>PRIMER MIX</i> ⁽²⁾	1 µL	100 µM <i>PRIMER MIX</i> ⁽³⁾	0,5 µL
H ₂ O	12 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	18 µL
<i>BIO-X-ACT SHORT</i> 4U/µL	0,5 µL	<i>BIO-X-ACT SHORT</i> 4U/µL	0,5 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 8 µL		AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

⁽²⁾ *Primers* diretos: Gag2 e PR1 e *primers* reversos: RT137 e RT3303.

⁽³⁾ *Primer* direto: PR3 e *primer* reverso: PR4.

TABELA 3.12: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região *pol* (PR) do VIH-1.

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>POL</i> (PR) DE VIH-1				
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1	95°C, 5min	X 1
DESNATURAÇÃO	94°C, 30s	X 30	94°C, 30s	X 30
HIBRIDAÇÃO	52°C, 30s		52°C, 30s	
SÍNTESE	72°C, 1min		72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 10min	X 1	72°C, 10min	X 1

Relativamente à região da transcriptase reversa, RT, a primeira amplificação foi realizada através do sistema *PuReTaq Ready-to-go™ PCR Beads* (GE Healthcare, England), utilizando igualmente os quatro *primers* referidos para a primeira amplificação da protease descritos por Steegan *et al.*, 2006^[98].

A segunda amplificação foi realizada com a enzima *AmpliTaq Gold®* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*), utilizando-se os *primers* RT1 e RT4 (posições 2604-2632 e 3231-3253 no isolado HXB2).

A mistura de reação e o programa de amplificação para a região da transcriptase reversa encontram-se descritos na **Tabela 3.13** e **Tabela 3.14**.

TABELA 3.13: Mistura de reação usada para a primeira (A) e segunda amplificação (B) da região *pol* (RT) do VIH-1.

A)		B)	
MISTURA DE REAÇÃO COM READY-TO-GO™ PCR BEADS		MISTURA DE REAÇÃO COM AMPLITAQ GOLD®	
1º PCR <i>POL</i> (PRIMERS EXTERNOS)		2º PCR RT (PRIMERS INTERNOS)	
PCR BEADS	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)	MISTURAS DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 50 µL)
10 µM PRIMER GAG2	0,5 µL	10X PCR BUFFER	5 µL
10 µM PRIMER PR1	0,5 µL	25 mM MgCl ₂	3 µL
10 µM PRIMER RT137	0,5 µL	1,25 mM dNTPs	8 µL
10 µM PRIMER RT3303	0,5 µL	10 µM PRIMER RT1	1 µL
H ₂ O	17 µL ⁽¹⁾	10 µM PRIMER RT4	1 µL
		H ₂ O	30,5 µL
		5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,5 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 6 µL		AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

TABELA 3.14: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região *pol* (RT) do VIH-1 (A) e (B).

A)			B)		
PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>POL</i> (RT) DE VIH-1			PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>POL</i> (RT) DE VIH-1		
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	ETAPAS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1	DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 45s	X 10	DESNATURAÇÃO	95°C, 45s	X 20
HIBRIDAÇÃO	45°C, 1min		HIBRIDAÇÃO	50°C, 1min	
SÍNTESE	72°C, 1min		SÍNTESE	72°C, 1min	
DESNATURAÇÃO	95°C, 45s	X 25	DESNATURAÇÃO	95°C, 45s	X 20
HIBRIDAÇÃO	50°C, 1min		HIBRIDAÇÃO	55°C, 1min	
SÍNTESE	72°C, 1min		SÍNTESE	72°C, 1min	
DESNATURAÇÃO	95°C, 45s	X 20	DESNATURAÇÃO	95°C, 45s	X 20
HIBRIDAÇÃO	55°C, 1min		HIBRIDAÇÃO	55°C, 1min	
SÍNTESE	72°C, 1min		SÍNTESE	72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1	EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1

3.2.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DA INTEGRASE DO VIH-1

Para a região da integrase, IN, utilizaram-se os *primers* descritos por Burns, *et al.*, 2002 ^[100] combinados de modos diferentes para a realização de três amplificações. Foram utilizados na primeira amplificação os *primers* externos polOc_for e HIV-vif2_rev (posições 3855-3877 e 5243-5264 no isolado HXB2) recorrendo à enzima – *Expand High Fidelity* (Roche, Roche Diagnostics, Germany). Numa segunda amplificação, utilizou-se os mesmos *primers* polOc_for e HIV-vif2_rev usados na primeira amplificação, mas adicionando um terceiro, polO_for (posição 4059-4080 no isolado HXB2) para uma segunda amplificação com *BIO-X-ACT™ DNA Polymerase* (Bioline, London, England). Na terceira amplificação, foi utilizado a mesma enzima e os *primers* internos polI_for e HIV-pol8_rev (posições 4159-4180 e 5043-5064 no isolado HXB2), para amplificação da região da integrase.

A mistura de reação e o programa de amplificação utilizados encontram-se descritos respetivamente nas Tabelas 3.15, 3.16 e 3.17.

TABELA 3.15: Mistura de reação usada para a primeira amplificação da região *pol* (IN) do VIH-1.

MISTURA DE REAÇÃO COM <i>EXPAND HIGH FIDELITY</i>	
1º PCR <i>POL</i> (IN) (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS)	
MISTURA DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)
10x PCR BUFFER	5 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL
10 µM <i>PRIMER</i> POLOC_FOR	1,5 µL
10 µM <i>PRIMER</i> HIV-VIF2_REV	1,5 µL
H ₂ O	6,25 µL ⁽¹⁾
<i>EXPAND HIGH FIDELITY</i>	0,75 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 8 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

TABELA 3.16: Mistura de reação usada para a segunda e terceira amplificação da região *pol* (IN) do VIH-1.

MISTURA DE REAÇÃO COM <i>BIO-X-ACT™ DNA POLYMERASE</i>			
2º PCR <i>POL</i> (IN) (<i>PRIMERS</i> EXTERNOS)		3º PCR <i>POL</i> (IN) <i>PRIMERS</i> INTERNOS)	
MISTURA DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 50 µL)	MISTURAS DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 50 µL)
10x OPTIBUFFER	5 µL	10x OPTIBUFFER	5 µL
50 mM MgCl ₂	2 µL	50 mM MgCl ₂	2 µL
100 mM dNTPs	1 µL	100 mM dNTPs	1 µL
100 µM <i>PRIMER MIX</i> ⁽²⁾	1 µL	100 µM <i>PRIMER MIX</i> ⁽²⁾	1 µL
H ₂ O	38 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	38 µL
<i>BIO-X-ACT SHORT</i> 4U/µL	1 µL	<i>BIO-X-ACT SHORT</i> 4U/µL	1 µL
AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL		AMOSTRA PRODUTO 2º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

⁽²⁾ *Primers* diretos: polOc_for e polO_for e *primer* reverso: HIV-vif2_rev.

⁽³⁾ *Primer* direto: polI_for e *primer* reverso: HIV-pol8_rev.

TABELA 3.17: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região *pol* (IN) do VIH-1: A, primeira amplificação, B, segunda e terceira amplificação.

A)

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>POL</i> (IN) DE VIH-1		
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	92°C, 2min	X 1
DESNATURAÇÃO	94°C, 45s	X 25
HIBRIDAÇÃO	50°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 25
HIBRIDAÇÃO	55°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1

B)

PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO IN DE VIH-1				
ETAPAS	2º PCR	Nº DE CICLOS	3º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1	95°C, 5min	X 1
DESNATURAÇÃO	94°C, 30s	X 30	94°C, 30s	X 30
HIBRIDAÇÃO	50°C, 30s		50°C, 30s	
SÍNTESE	72°C, 1min		72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 10min	X 1	72°C, 10min	X 1

3.2.4 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO *ENV* DO VIH-1

A região *env* foi amplificada utilizando os *primers* descritos por Delwart *et al.*, 1997 ^[101]. A primeira amplificação foi realizada com *PuReTaq Ready-to-go™ PCR Beads* (GE Healthcare, England), utilizando os *primers* ED5 e ED12 (posições 6557-6582 e 7782-7811 no isolado HXB2) e a segunda amplificação foi realizada com a enzima *AmpliTaQ Gold®* (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando-se os *primers* ES7 e ES8 (posições 6983-7021 e 7648-7668 no isolado HXB2).

A mistura de reação usada nas duas amplificações e o programa de amplificação encontram-se descritos na **Tabela 3.18** e **Tabela 3.19**.

TABELA 3.18: Mistura de reação usada para a primeira (A) e segunda (B) amplificação da região *env* do VIH-1.

A)

MISTURA DE REAÇÃO COM READY-TO-GO™ PCR BEADS	
1º PCR <i>ENV</i> (PRIMERS EXTERNOS)	
MISTURA DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)
10 µM PRIMER ED5	1 µL
10 µM PRIMER ED12	1 µL
H ₂ O	17 µL ⁽¹⁾
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 6 µL	

B)

MISTURA DE REAÇÃO COM AMPLITAQ GOLD®	
2º PCR <i>ENV</i> (PRIMERS INTERNOS)	
MISTURAS DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 50 µL)
10X PCR BUFFER	5 µL
25 mM MgCl ₂	3 µL
1,25 mM dNTPs	8 µL
10 µM PRIMER ES7	2 µL
10 µM PRIMER ES8	2 µL
H ₂ O	27,75 µL
5 U/µL AMPLITAQ® GOLD	0,25 µL
AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

TABELA 3.19: Programa de amplificação utilizado para amplificação da região *env* do VIH-1. Primeira (A) e segunda (B) amplificação.

A)

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>ENV</i> DE VIH-1		
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 10
HIBRIDAÇÃO	45°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 30
HIBRIDAÇÃO	50°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1

B)

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>ENV</i> DE VIH-1		
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 5
HIBRIDAÇÃO	45°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 15
HIBRIDAÇÃO	50°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
DESNATURAÇÃO	95°C, 30s	X 20
HIBRIDAÇÃO	55°C, 45s	
SÍNTESE	72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 7min	X 1

3.2.5 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *NEF* DO VIH-1

O gene *nef* foi amplificado utilizando os *primers* descritos por Parreira *et al.*, 2005 ^[102]. A primeira amplificação realizou-se com *BIO-X-ACT™ DNA Polymerase* (Bioline, London, England), utilizando os *primers* externos H1NefOf e H1NefOr (posições 8513-8533 e 9488-9508 no isolado HXB2). A segunda amplificação foi também realizada com a mesma enzima, tendo sido utilizado os *primers* internos H1NefIf e H1NefIr (posições 8697-8717 e 9448-9468 no isolado HXB2). As misturas de reação e o programa de amplificação utilizados encontram-se descritos respetivamente na **Tabela 3.20** e **Tabela 3.21**.

TABELA 3.20: Mistura de reação usada para a primeira e segunda amplificação da região *nef* do VIH-1.

MISTURA DE REAÇÃO COM <i>BIO-X-ACT™ DNA POLYMERASE</i>			
1º PCR <i>NEF</i> (PRIMERS EXTERNOS)		2º PCR <i>NEF</i> (PRIMERS INTERNOS)	
MISTURA DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)	MISTURAS DA REAÇÃO	VOLUME (TOTAL DE 25 µL)
10X OPTIBUFFER	5 µL	10X OPTIBUFFER	5 µL
50 mM MgCl ₂	2 µL	50 mM MgCl ₂	2 µL
100 mM dNTPs	0,5 µL	100 mM dNTPs	1 µL
100 µM PRIMER MIX ⁽²⁾	1 µL	100 µM PRIMER MIX ⁽³⁾	1 µL
H ₂ O	32 µL ⁽¹⁾	H ₂ O	38 µL
<i>BIO-X-ACT</i> SHORT 4U/µL	1 µL	<i>BIO-X-ACT</i> SHORT 4U/µL	1 µL
AMOSTRA DNA EXTRAÍDO DE CMSP: 8 µL		AMOSTRA PRODUTO 1º PCR: 2 µL	

⁽¹⁾ O volume de água a adicionar é ajustado ao volume total da reação e depende do volume de amostra adicionada.

⁽²⁾ *Primer* direto: H1NefOf e *primer* reverso: H1NefOr.

⁽³⁾ *Primer* direto: H1NefIf e *primer* reverso: H1NefIr.

TABELA 3.21: Programa de amplificação utilizado para amplificação do gene *nef* do VIH-1.

PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO <i>NEF</i> DE VIH-1				
ETAPAS	1º PCR	Nº DE CICLOS	2º PCR	Nº DE CICLOS
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C, 5min	X 1	95°C, 5min	X 1
DESNATURAÇÃO	94°C, 30s	X 30	94°C, 30s	X 30
HIBRIDAÇÃO	50°C, 30s		50°C, 30s	
SÍNTESE	72°C, 1min		72°C, 1min	
EXTENSÃO FINAL	72°C, 10min	X 1	72°C, 10min	X 1

4. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Após as amostras terem sido submetidas a amplificação das regiões genómicas do VIH-1 e/ou VIH-2, alíquotas dos produtos amplificados foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,4% (corrida eletroforética durante 60 minutos, a 175 V), em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). O gel foi contrastado com corante GelRed™ (*Biotium, California, USA*) e/ou SybrSafe (*Invitrogen, California, USA*) e fotografado sob luz ultravioleta.

Posteriormente, foi efetuada a comparação entre as bandas obtidas nas amostras e o perfil de bandas do marcador “HyperLadder™ 50bp” (*Bioline, London, United Kingdom*), cuja massa molecular era conhecida. Os fragmentos esperados para as diferentes regiões genómicas do VIH amplificadas foram os seguintes:

- Para a região LTR e *pol* do VIH-1, os pares de *primers* internos originaram respetivamente um fragmento de 124 e 143 pb;
- Para a região LTR e *pol* do VIH-2, os pares de *primers* internos originaram respetivamente um fragmento de 141 e 311 pb;
- Para a região *gag*, a primeira e a segunda opção de escolha de um par de *primers* internos originou respetivamente fragmentos de 805 e 445 pb;
- Para a região *pol*, os pares de *primers* internos especificamente para PR, RT e IN originaram fragmentos, respetivamente de 459, 649 e 905 pb;
- Para a região *env*, os *primers* internos originaram um fragmento de 685 pb;
- Para o gene *nef*, os *primers* internos originaram um fragmento de 771 pb.

5. PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIH-1

Os produtos amplificados das várias regiões genômicas para caracterização molecular de VIH-1 que revelaram a presença de uma banda de massa molecular esperada, observada em gel de agarose, foram purificadas utilizando o *kit* ExoSap-IT Clean Up (*GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom*), seguindo as instruções do fabricante. Este processo permite a eliminação de restos de *primers* e/ou outros constituintes não consumidos durante as reações de amplificação, evitando a sua possível interferência na reação de sequenciação. Este método de purificação utilizando o *kit* ExoSap consiste na adição de 2 μ L de enzima a cada 5 μ L de produto de PCR, sendo a manipulação dos tubos e reagentes feita em gelo. Cada mistura foi colocada num termociclador, tendo sido submetida a um programa de purificação a 37°C, durante 15 min e 80°C, durante 15 min.

Após purificação dos produtos foram realizadas as reações de sequenciação utilizando o *kit* comercial BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (*Applied BioSystems, California, USA*), seguindo as instruções do fabricante. Em cada tubo de reação foram utilizados 1 μ L dos *primers* internos das respetivas reações de amplificação, a uma concentração de 1 μ M, 1 μ L de Big Dye, entre 1 a 5 μ L de produto purificado (consoante a sua concentração, previamente verificada em gel de agarose), tendo sido posteriormente ajustado o volume de reação com adição de H₂O, para um volume total de 10 μ L.

Os produtos purificados foram submetidos a um programa de sequenciação com 25 ciclos, cada um com uma desnaturação de 96°C durante 30 segundos, hibridação a 50°C, durante 15 segundos e uma síntese a 60°C, durante 4 minutos.

Após a reação de sequenciação, os tubos foram entregues na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do INSA, onde se realizou a precipitação e eletroforese capilar das amostras para obtenção dos cromatogramas e sua posterior análise.

6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DAS REGIÕES *GAG*, *POL*, *ENV* E *NEF* DO VIH-1

6.1 CONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONSENSO

Os cromatogramas das sequências nucleotídicas foram analisados e editados com auxílio do programa *Chromas Lite 2.6.5*.^[103] A construção de uma sequência consenso para cada amostra e para cada região genômica foi realizada através do programa MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis)^[104].

6.2 INFERÊNCIA FILOGENÉTICA E CLASSIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

A árvore filogenética foi construída recorrendo ao programa MEGA7^[104]. O método utilizado para a construção da árvore foi o *Neighbour Joining*^[105] a partir de múltiplos alinhamentos e a matriz de distâncias foi determinada com base no modelo de Kimura a dois parâmetros^[106]. A robustez da topologia da árvore foi calculada por *bootstrapping* em 1000 réplicas e apenas os valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 70% foram considerados estatisticamente significativos.

As sequências consenso obtidas para a região de caracterização molecular do VIH-1 foram submetidas a uma análise de mutações de resistência através do programa HIV-Grade^[107], utilizando o algoritmo ANRS.

IV. RESULTADOS

1. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS RECEBIDAS NO LABORATÓRIO NO ÂMBITO DE DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TMF DO VIH, ENTRE 1 DE OUTUBRO DE 2017 A 31 DE MARÇO DE 2018

1.1 PROVENIÊNCIA E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DAS AMOSTRAS ANALISADAS

No período de tempo estabelecido de 6 meses, foram rececionadas e processadas 325 amostras de sangue, de acordo com o algoritmo laboratorial de diagnóstico precoce da infeção VIH publicado na literatura (Pádua, *et al.*, 2009) ^[49]. Foram analisadas 223 amostras de crianças em risco de infeção VIH, e foram também processadas 102 amostras maternas, que se relacionavam com o conjunto de crianças a quem pela primeira vez foi colhido sangue para diagnóstico da TMF do VIH. Das 223 amostras de crianças em risco de infeção VIH, 97,8% (n=218) foram submetidas a amplificação para VIH-1, 1,8% (n=4) para VIH-2 e 0,4% (n=1) para os dois tipos virais, de acordo com a identificação do tipo de vírus presente na amostra materna.

A maioria das amostras (80,7%; n=180) foi enviada de instituições de saúde (hospitais e maternidades) pertencentes à área territorial de Lisboa, sendo que 7,6% (n=17) delas foram recebidas de instituições de saúde da região Centro, 6,3% (n=14) do Algarve, 2,7% (n=6) vieram da região Norte, 2,2% (n=5) do Alentejo e 0,4% (n=1) da Madeira (distribuição das instituições de saúde segundo a Nomenclatura das Unidades Territoriais de nível 2 – NUTS II).

Atendendo à informação epidemiológica conhecida associada às 223 amostras, verificou-se que 44,4% (n=99) das amostras estavam relacionadas com crianças de ascendência africana.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ATENDENDO ÀS MEDIDAS DE PREVENÇÃO DA TMF DO VIH

No total das 223 amostras de crianças recebidas durante o período de 6 meses, verificou-se que 177 (79,4%) tinham feito, ou estavam a fazer, profilaxia antirretrovírica de prevenção da TMF do VIH (monoterapia com AZT durante as primeiras 4-6 semanas de vida), em dois casos (0,9%) não foi realizada profilaxia e em 44 (19,7%) dos casos não era conhecida informação relativa aos regimes profiláticos antirretrovíricos de prevenção que foram administrados ao recém-nascido.

Em função da informação sobre as medidas de prevenção seguidas durante a gravidez, observou-se que para 13,9% (n=31) das amostras de crianças analisadas, as mães não cumpriram medidas de TAR de prevenção, sendo que destas 31 amostras, 25,8% (n=8) correspondiam a amostras de crianças com ascendência africana. Para 70,0% (n=156) das amostras das crianças analisadas existiu total adesão materna ao protocolo de prevenção, verificando-se que destas 156 amostras, 22,4% (n=35) correspondiam a amostras de crianças com ascendência africana. Em 16,1% (n=36) dos casos analisados, a informação sobre o cumprimento das medidas de prevenção na gravidez não era conhecida.

1.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE TMF DO VIH-1 E VIH-2

Nas 325 amostras de sangue recebidas no laboratório, realizou-se a separação das CMSP, foi extraído o DNA, e este foi submetido a amplificação do VIH-1 e/ou VIH-2, de acordo com o tipo de vírus em causa identificado na amostra materna. Os produtos amplificados foram observados após a corrida de eletroforese em gel de agarose. A **Figura 4.1** é um exemplo ilustrativo dos resultados obtidos para algumas amostras (crianças e mães) submetidas a amplificação do VIH-1 (A) e do VIH-2 (B), observando-se nos casos positivos uma banda de massa molecular esperada de 124 pb para o VIH-1 e de 141 pb para o VIH-2.

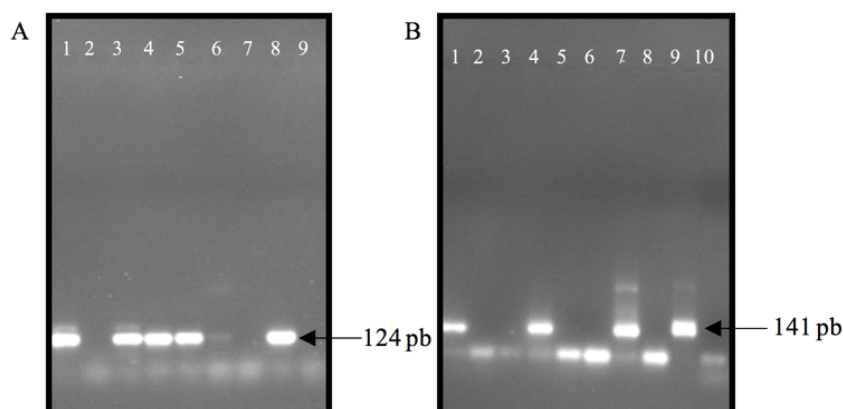


FIGURA 4.1: Produtos resultantes da segunda amplificação para VIH-1 (A) e VIH-2 (B), visualizados em gel de agarose. A: Entre os poços 1 a 7 foram aplicadas amostras e nos poços 8 e 9 os controlos, respetivamente, o positivo e o negativo. B: Entre os poços 1 a 8 foram aplicadas amostras e nos poços 9 e 10 os controlos, respetivamente, positivo e negativo.

Das 223 amostras de crianças submetidas a amplificação, obtiveram-se 222 amostras com resultados negativos para VIH-1 e VIH-2 e uma única amostra com resultado positivo, diagnosticando-se assim, um caso de TMF do VIH-1 no período de tempo estabelecido. Analisando os dados disponíveis para o caso de TMF do VIH-1, verificou-se que a criança, do sexo feminino, não realizou profilaxia antirretrovírica de prevenção e a mãe, de nacionalidade portuguesa, também não seguiu qualquer regime antirretrovírico de prevenção da TMF do VIH. Não conhecendo o seu estado serológico, a mãe amamentou a criança até aos dois meses de idade.

Seguindo o previamente delineado para o desenvolvimento do presente estudo, a amostra positiva da criança e a amostra da respetiva mãe infetada, foram ambas selecionadas para uma análise molecular do VIH-1 detalhada, visando a classificação genómica do vírus que foi transmitido da mãe ao filho.

1.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIH-1 NO PAR DE AMOSTRAS MÃE-FILHO POSITIVAS

1.4.1 AMPLIFICAÇÃO, SEQUENCIAÇÃO E CONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE CONSENSO PARA AS REGIÕES GENÓMICAS EM ESTUDO

As amostras de DNA foram submetidas a amplificação das regiões *gag*, *pol* (PR, RT e IN), *env* e *nef* de VIH para caracterização genómica do VIH-1. A **Figura 4.2** mostra os resultados da amplificação obtidos para as duas amostras em estudo.

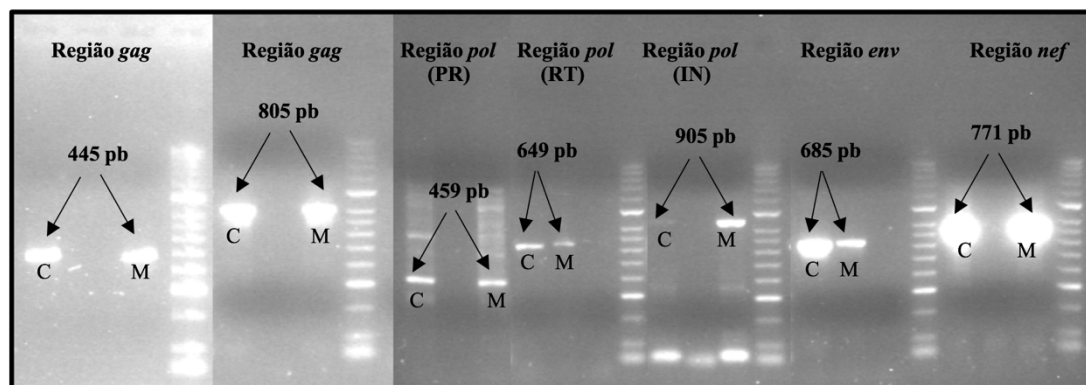


FIGURA 4.2: Análise de produtos amplificados para várias regiões genômicas do VIH-1 a partir das amostras da criança (C) e respetiva mãe (M): *gag* (445 e 805 pb), *pol* (PR, RT e IN) (459, 649 e 905 pb) *env* (685 pb) e *nef* (771 pb) do VIH-1. A figura ilustra diferentes corridas de eletroforese em gel de agarose, apresentando em todas uma amostra da criança (C), uma amostra da mãe (M) e um controlo negativo. Foi aplicado o marcador “HyperLadder™ 50bp” (Bioline, London, United Kingdom), com um perfil de massa molecular compreendido entre 15 e 2000 pb.

Posteriormente, todos os produtos amplificados foram purificados e sequenciados por metodologia Sanger. Foi possível construir as respetivas sequências de consenso para a região *gag*, RT, IN, *env* e *nef* de ambas as amostras, no entanto, para a região PR, apenas foi possível obter a sequência de consenso para a amostra da criança. As sequências obtidas para a região PR derivada da amostra materna apresentavam cromatogramas com leitura de baixa qualidade pelo que não foi construída a sequência de consenso.

1.4.2 CLASSIFICAÇÃO VIH-1 POR FILOGENIA

Com exceção da sequência de consenso da região PR derivada da amostra materna, todas as restantes sequências de consenso, para cada região, foram obtidas a partir da análise de cromatogramas gerados por sequenciação Sanger usando ferramentas do programa MEGA7. Para uma classificação inicial das sequências de consenso, estas foram submetidas ao programa Blast recorrendo à base de dados de sequências VIH de *Los alamos* [108]. A classificação inicial destas sequências na base de dados revelou serem semelhantes à CRF14_BG. No entanto, para uma análise mais robusta das sequências de VIH-1 foi usada a estimativa filogenética para classificação do VIH-1. Para proceder a esta análise, foi retirado da base de dados um alinhamento de múltiplas sequências de referência para todos os subtipos de VIH-1 e da maioria dos recombinantes identificados no mundo. A este alinhamento foram adicionadas as sequências derivadas das 2 amostras em estudo (par mãe-filho) e feito novo alinhamento, bem como efetuado os ajustes normais necessários para obtenção da sequência concatenada contendo sequencialmente informação para as regiões *gag*, RT, IN, *env* e *nef* do VIH-1. Este alinhamento serviu de base à realização da filogenia para classificação das sequências derivadas do par de amostras mãe-filho.

A árvore filogenética concatenada (**Figura 4.3**) revelou que as sequências de referência formaram diferentes agrupamentos para os diferentes subtipos e CRF de VIH-1, apresentando elevados valores de *bootstrap*. As sequências derivadas das 2 amostras em estudo (C + M) agruparam com valores de *bootstrap* de 100% estando incluídas no agrupamento de sequências de referência para a CRF14_BG (agrupamento com valor de *bootstrap* de 98%). Deste modo, a análise filogenética classificou as sequências em estudo de sequências CRF14_BG do VIH-1.

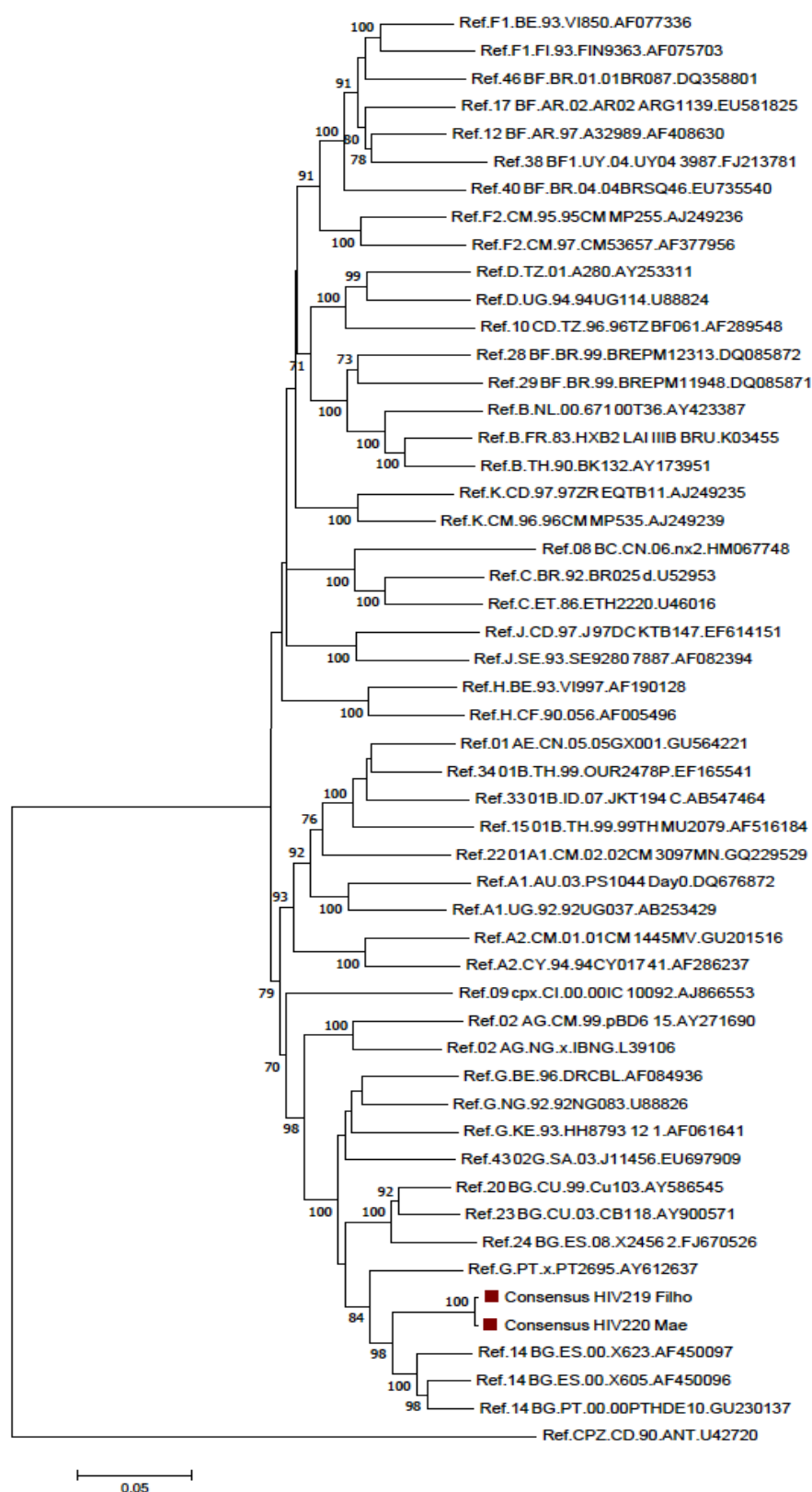


FIGURA 4.3: Árvore filogenética concatenada construída a partir de um alinhamento de sequências contendo as regiões *gag*, *pol* (RT e IN), *env* e *nef* de VIH-1, correspondendo a um fragmento total analisado de 4028 pb e que inclui as sequências derivadas das duas amostras em estudo (mãe e filho verticalmente infetado, assinalados com ■) com 50 sequências de referência retiradas da base de dados de VIH de *Los Alamos* que incluem todos os subtipos e a maioria dos recombinantes de VIH-1 identificados no mundo.

1.4.3 ANÁLISE DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA PARA A REGIÃO ALVO DOS ANTIRRETROVIRAIS

a) INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Na análise das sequências de consenso (par mãe-filho) obtidas para a região RT, não se observou qualquer mutação de resistência. No entanto, foram verificadas 11 alterações de aminoácidos quando a sequência de consenso foi comparada com a sequência de referência HXB2 (Tabela 4.1).

TABELA 4.1: Mutações identificadas para a região RT, PR e IN no par de amostras mãe-filho em comparação com a sequência de referência HXB2.

	TRANSCRIPTASE REVERSA											PROTEASE											INTEGRASE																			
REFERÊNCIA HXB2	35V	60V	98A	135I	173K	174Q	177D	195I	207Q	211R	214L	13I	14K	17G	20K	35E	36M	37S	41R	63L	67C	69H	82V	89L	10D	11E	13E	50M	72V	94G	101L	123G	127R	134G	136K	165V	206T	232N	234L	255S	256D	
MÃE	T	I	S	T	I	K	E	L	G	K	F														E	D	D	T	I	R	I	C	K	N	T	I	S	D	I	N	E	
FILHO	T	I	S	T	I	K	E	L	G	K	F	V	R	E	I	**	D	L*	D	K	P	H	K*	I	M*	E	D	D	T	I	R	I	C	K	N	T	I	S	D	I	N	E

*Mutações de resistência ao fármaco tipranavir; ** Mutações de resistência ao fármaco atazanavir.

b) INIBIDORES DA PROTEASE

Na análise da sequência de consenso obtida para a região PR, derivada da amostra da criança, observou-se a ocorrência de 4 mutações de resistência – K20I, M36L, H69K e L89M. As mutações M36L, H69K e L89M conferem resistência ao fármaco tipranavir (TPV) e a mutação K20I confere resistência ao fármaco atazanavir (ATV) (Tabela 4.1). Verificaram-se ainda 9 alterações de aminoácidos quando a sequência de consenso foi comparada com a sequência de referência HXB2 (Tabela 4.1).

c) INIBIDORES DA INTEGRASE

Na análise das sequências de consenso (par mãe-filho) obtidas para a região IN, não se observou qualquer mutação de resistência. No entanto, foram verificadas 17 alterações de aminoácidos quando a sequência de consenso foi comparada com a sequência de referência HXB2 (Tabela 4.1).

2. ESTUDO DA POPULAÇÃO DE CRIANÇAS EM RISCO DE INFECÇÃO POR VIH, ENTRE 2006 E 2016

2.1 A POPULAÇÃO E A PROVENIÊNCIA DAS AMOSTRAS

Amostras de sangue colhidas para seguimento laboratorial das crianças estudadas no âmbito do diagnóstico precoce da TMF do VIH foram enviadas ao laboratório durante o período 2006-2016, a partir de diferentes instituições de saúde (hospitais e maternidades) de todo o território português, sendo efetuada a distribuição da sua proveniência por NUTS II, o que corresponde ao local de nascimento das crianças. A distribuição das 2250 crianças estudadas foi a seguinte: 74,3% (n=1672) pertencentes à região de Lisboa, 8,8% (n=199) à região Centro, 6,6% (n=148) pertencentes ao Algarve, 5,6% (n=127) ao Norte, 3,6% (n=81) ao Alentejo, 0,8% (n=19) à Madeira e 0,2% (n=4) aos Açores. No período acima referido, foram recebidas 7509 amostras de sangue no laboratório para o diagnóstico precoce da TMF do VIH de 2250 crianças nascidas de mães infetadas por VIH: 2101 (93,4%) crianças em risco de infeção por VIH-1, 139 (6,2%) em risco de infeção por VIH-2 e 10 (0,4%) em risco de infeção por VIH-1 e VIH-2.

A metodologia utilizada para diagnóstico foi a pesquisa de DNA proviral do VIH-1 e/ou VIH-2 em várias amostras (3-5) colhidas sequencialmente no tempo, durante pelo menos os primeiros 6 meses de vida das crianças e de acordo com o protocolo laboratorial estabelecido ^[49]. Porém, em 124 crianças foi recebida apenas 1 amostra e em 209 crianças 2-3 amostras sendo a última amostra colhida à criança com idade inferior a 120 dias de vida. Nestas 333 (14,8%) crianças, o diagnóstico laboratorial da TMF do VIH não foi concluído. Deste modo, do total das 2250 crianças em estudo, 1917 (85,2%) completaram o seguimento laboratorial para diagnóstico precoce de TMF do VIH.

2.2 ANÁLISE DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS RECOLHIDOS

Na distribuição das crianças por sexo, observou-se que 49,8% (n=1120) eram do sexo masculino, 48,4% (n=1090) do sexo feminino e em 1,8% (n=40) esta informação não era conhecida.

No cálculo da idade média materna, realizado à data do parto, verificou-se que foi de 31,1 anos, variando entre um mínimo de 15 anos e um máximo de 50 anos de idade.

Atendendo à naturalidade das mães das crianças em estudo, observou-se que 46,3% (n=1041) eram de naturalidade Portuguesa, 1,8% (n=41) naturais de outros países europeus, 38,4% (n=864) nasceram em países africanos, 3,6% (n=81) nasceram em países do continente americano e 0,2% (n=5) nasceram em países asiáticos. Em 9,7% (n=218) das crianças em estudo, a origem geográfica das mães não era conhecida.

As características epidemiológicas da população em risco da infeção VIH, anualmente estudada durante o período 2006-2016, encontram-se apresentadas na **Figura 4.4**. Esta análise foi efetuada também para a população de crianças em risco de infeção agrupada pelo tipo de vírus (VIH-1 e VIH-2) (**Figura 4.4**). Foram analisadas apenas as variáveis de sexo, naturalidade e idade materna, dos casos com os dados conhecidos.

Atendendo a que a epidemia da infeção VIH-2 se encontra restrita a países da África ocidental, foi analisado a associação do tipo de vírus e a ascendência africana ou portuguesa das crianças, verificando-se existir associação estatisticamente significativa entre o VIH-2 e a ascendência africana das crianças estudadas ($p=0,001$; Teste Exato de Fisher).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
CRIANÇAS EM RISCO DE INFECÇÃO VIH											
SEXO MASCULINO	56,0% (121)	51,1% (118)	52,10% (124)	45,9% (107)	48,3% (126)	55,6% (115)	50,3% (92)	44,0% (70)	50,3% (93)	54,9% (79)	49,0% (75)
MÉDIA DE IDADE MATERNA	30,6 (195)	29,8 (217)	30,1 (213)	30,3 (222)	30,8 (248)	31,3 (199)	32,1 (177)	32,0 (140)	32,5 (164)	32,0 (136)	33,0 (149)
ASCENDÊNCIA PORTUGUESA	53,9% (103)	50,9% (110)	53,0% (116)	51,3% (116)	49,6% (123)	54,4% (105)	47,4% (83)	48,9% (67)	54,5% (85)	43,4% (63)	50,7% (70)
ASCENDÊNCIA AFRICANA	45,0 % (86)	42,6% (92)	39,7% (87)	40,7% (92)	45,2% (112)	37,3% (72)	41,7% (73)	46,7% (64)	40,4% (63)	43,4% (63)	43,5% (60)
CRIANÇAS EM RISCO DE INFECÇÃO VIH-1											
SEXO MASCULINO	57,2% (111)	50,7% (107)	52,0% (116)	46,1% (100)	49,4% (116)	58,5% (114)	49,4% (88)	44,7% (67)	51,1% (90)	56,0% (79)	49,7% (72)
MÉDIA DE IDADE MATERNA	30,1 (175)	29,8 (198)	30,0 (200)	30,1 (206)	30,6 (22)	31,2 (188)	32,0 (172)	32,0 (132)	32,4 (156)	31,9 (132)	33,0 (141)
ASCENDÊNCIA PORTUGUESA	58,1% (100)	54,1% (106)	55,3% (114)	54,8% (115)	53,2% (118)	58,0% (105)	48,8% (83)	51,6% (66)	56,5% (83)	48,8% (63)	53,5% (69)
ASCENDÊNCIA AFRICANA	40,7% (70)	39,3% (77)	36,9% (76)	36,7% (77)	41,4% (92)	33,2% (60)	40% (68)	43,8% (56)	38,1% (56)	45,7% (59)	40,3% (52)
CRIANÇAS EM RISCO DE INFECÇÃO VIH-2											
SEXO MASCULINO	47,6% (10)	55,6% (10)	50,0% (7)	46,7% (7)	39,1% (9)	9,1% (1)	80,0% (4)	25,0% (2)	33,3% (3)	0% (0)	37,5% (3)
MÉDIA DE IDADE MATERNA	35,3 (19)	30,4 (17)	32,3 (12)	31,9 (15)	32,2 (23)	33,3 (10)	36,6 (5)	34,3 (7)	34,4 (8)	35,3 (4)	32,3 (8)
ASCENDÊNCIA PORTUGUESA	16,7% (3)	22,2% (4)	16,7% (2)	6,7% (1)	21,7% (5)	0% (0)	0% (0)	12,5% (1)	22,2% (2)	0% (0)	11,1% (1)
ASCENDÊNCIA AFRICANA	83,3% (15)	72,2% (13)	83,3% (10)	93,3% (14)	73,9% (17)	100% (11)	100% (5)	87,5% (7)	77,8% (7)	100% (4)	88,9% (8)

FIGURA 4.4: Características epidemiológicas (sexo, naturalidade e idade materna) do total de crianças em risco de infeção e agrupadas atendendo ao ano de nascimento e tipo de vírus (VIH-1 e VIH-2) para o período 2006-2016.

2.3 AVALIAÇÃO DO ESTADO IMUNITÁRIO E DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIH-1 NA POPULAÇÃO MATERNA

a) CÉLULAS T CD4⁺

A avaliação do estado imunitário da população materna foi efetuada através da análise dos valores T CD4⁺ conhecidos e determinados à data próxima do parto. Esta informação era conhecida para 57,9% (n=1302) da população estudada. Verificou-se que 23,0% (n=300) das mães apresentavam valores de T CD4⁺ <350 células/mm³, 21,7% (n=282) valores T CD4⁺ entre 350 e 500 células/mm³ e 55,3% (n=720) valores T CD4⁺ superiores a 500 células/mm³. Atendendo apenas aos dados conhecidos de células T CD4⁺ foi analisada a distribuição destes valores de acordo com o tipo de vírus, sendo que os resultados obtidos para a infeção por VIH-1 e VIH-2 encontram-se descritos na **Figura 4.5**.

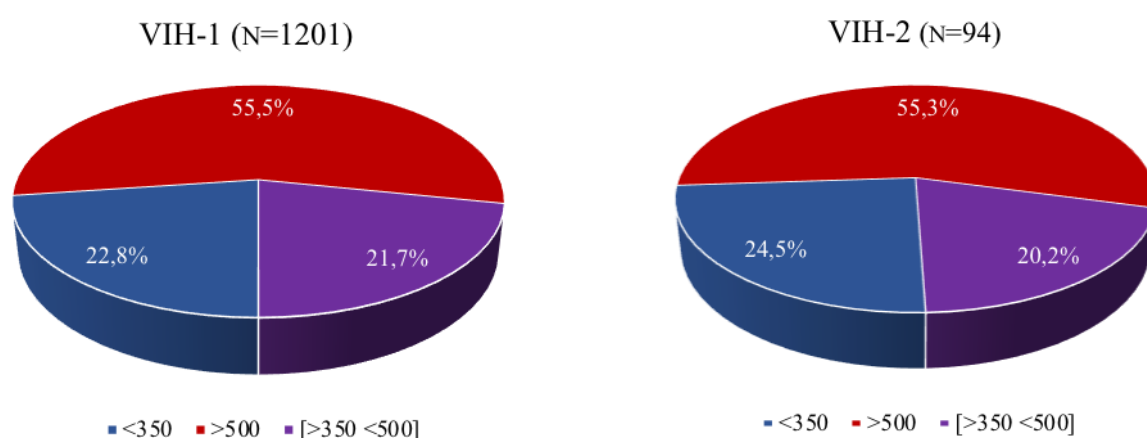


FIGURA 4.5: Distribuição dos casos atendendo ao número de células T CD4⁺ na população de mães infetadas com VIH-1 ou VIH-2.

b) Quantificação do RNA VIH-1

Os valores de RNA VIH-1 conhecidos à data do parto foram analisados para os casos de infeção VIH-1 (n=1753), observando-se que 70,2% (n=1231) das mães apresentavam valores de RNA VIH-1 indetetáveis (<50 cópias/mL). A análise dos restantes casos com carga viral detetável (29,8%; n=522) encontra-se apresentada na **Figura 4.6**.

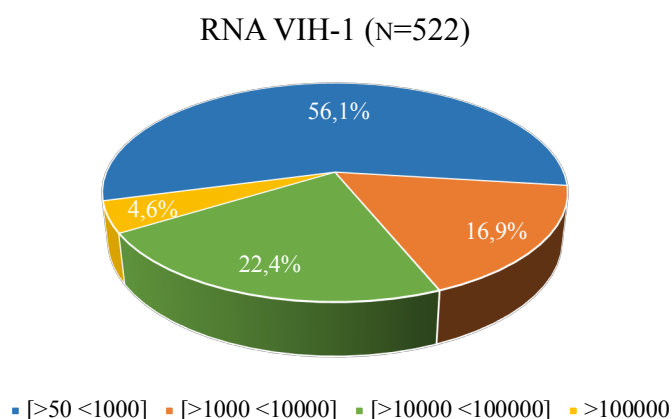


FIGURA 4.6: Distribuição dos casos com carga viral detetável na população materna infetada por VIH-1.

2.4 TAR NA PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO DO VIH

2.4.1 PROFILAXIA ANTIRRETROVÍRICA NO RECÉM-NASCIDO

Do total das 2250 crianças estudadas, 97,0% (n=2182) fizeram profilaxia TAR de prevenção, no entanto, verificou-se ainda que 1,0% (n=22) das crianças não fizeram e para 2,0% (n=46) dos casos, esta informação não era conhecida. Das crianças que fizeram profilaxia de prevenção, apenas em 690 (31,6%) era conhecida informação sobre a sua duração. A distribuição das crianças que fizeram 4 ou 6 semanas de profilaxia TAR de prevenção da TMF (N=690) entre 2006 e 2016 encontra-se apresentada na **Figura 4.7**.

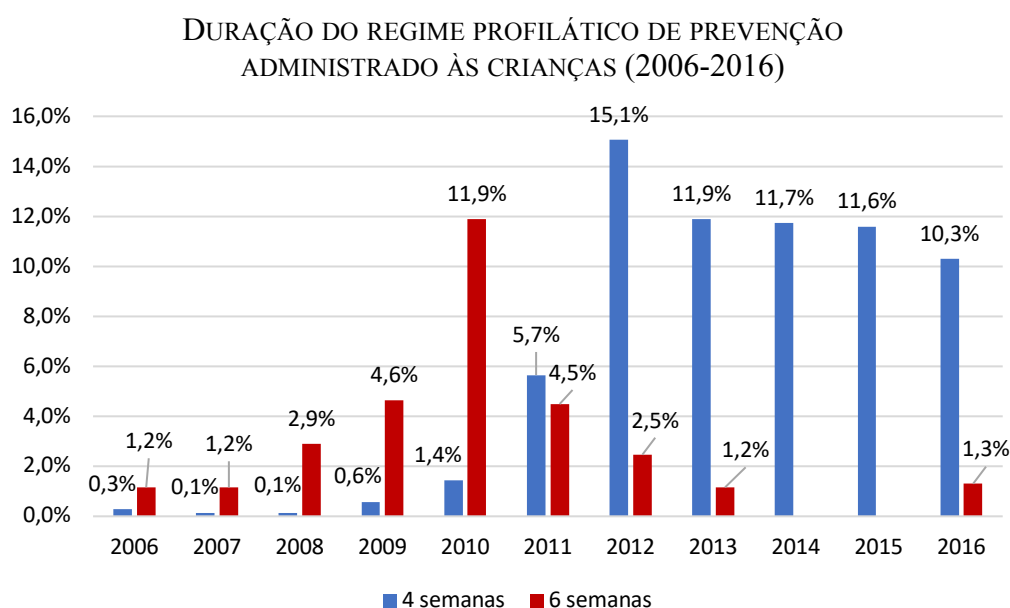


FIGURA 4.7: Distribuição das crianças que cumpriram regime profilático de prevenção da TMF de 4 ou 6 semanas, entre 2006 e 2016. Percentagens calculadas em função do total de crianças com informação conhecida (N=690).

Relativamente ao tipo de regime profilático de TAR administrado à criança, observou-se que a informação era conhecida para um total de 2132 casos, verificando-se que em 86,9% (n=1852) das crianças foi seguido um regime monoterapêutico de AZT. No entanto, outros tipos de regimes TAR de prevenção foram administrados. Em 11,0% (n=235) das crianças foi seguido um regime profilático contendo inibidores INTR e INNTR (maioritariamente, AZT+3TC+NVP). Em 1,8% (n=38) dos casos apenas foram administrados inibidores INTR (nomeadamente, AZT+3TC), e apenas esporadicamente entre 2006 e 2012. Em 0,3% (n=7) dos casos, foram seguidos regimes combinados de inibidores de RT com inibidores de PR, também administrados esporadicamente entre os anos de 2007 e 2016.

A distribuição anual dos regimes profiláticos mais frequentemente administrados às crianças entre 2006 e 2016, a monoterapia de AZT (código R1) e o regime de inibidores de RT combinando INTR com INNTR (código R2), encontra-se apresentada na **Figura 4.8**.

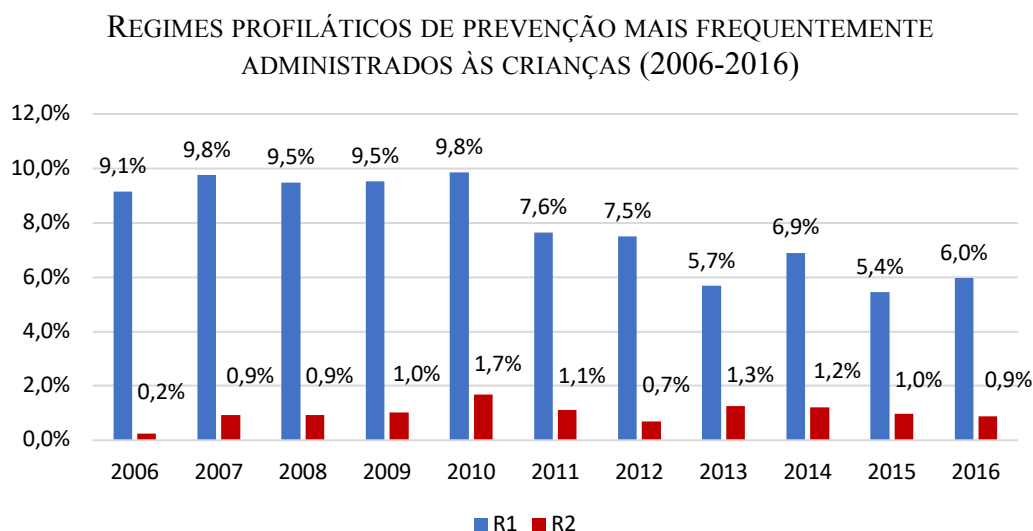


FIGURA 4.8: Distribuição das crianças atendendo a dois tipos de regimes profiláticos TAR de prevenção administrados com maior frequência entre 2006 e 2016 (R1, monoterapia de AZT; R2, regime ITR combinando INTR com INNTR). Percentagens foram calculadas em função do total de crianças com informação conhecida (N=2132), no entanto, não estão representados os outros regimes profiláticos administrados e que foram seguidos em 45 crianças.

2.4.2 CUMPRIMENTO DE TAR DE PREVENÇÃO NA GRAVIDEZ

Nas crianças em risco de infecção VIH, verificou-se que em 74,0% (n=1664) foram cumpridas as medidas de TAR de prevenção durante a gravidez: 95,2% (n=1584) correspondiam a grávidas infetadas por VIH-1, 4,3% (n=72) a grávidas infetadas por VIH-2 e 0,5% (n=8) a grávidas infetadas por VIH-1 e VIH-2.

Verificou-se ainda que 23,0% (n=518) das grávidas não cumpriram TAR de prevenção durante a gravidez: 87,3% (n=452) correspondiam a grávidas infetadas por VIH-1, 12,4% (n=64) a grávidas infetadas por VIH-2 e 0,4% (n=2) a grávidas infetadas por VIH-1 e VIH-2. Verificou-se que das 518 grávidas que não cumpriram TAR de prevenção na gravidez, 45,4% (n=235) correspondiam a mães de nacionalidade de portuguesa e 40,7% correspondiam a mães de nacionalidade africana.

Verificou-se ainda que das 518 grávidas que não cumpriram TAR, 45,0% (n=233) dos casos não foi administrada TAR, em 43,6% (n=226) dos casos o regime TAR foi iniciado tardiamente na gravidez e em 11,4% (n=59) dos casos a toma foi irregular.

Em 3,0% (n=68) dos casos a informação sobre o cumprimento de TAR de prevenção na gravidez não era conhecida.

Adicionalmente, observou-se que o grupo de mães que cumpriu TAR de prevenção (n=1664) apresentou um tempo de infecção superior quando comparado com o grupo de mães que não cumpriu TAR de prevenção (n=518), respetivamente 7,73 anos e 3,13 anos.

A distribuição de crianças atendendo ao cumprimento de TAR na gravidez, entre 2006 e 2016, encontra-se descrita na **Figura 4.9**.

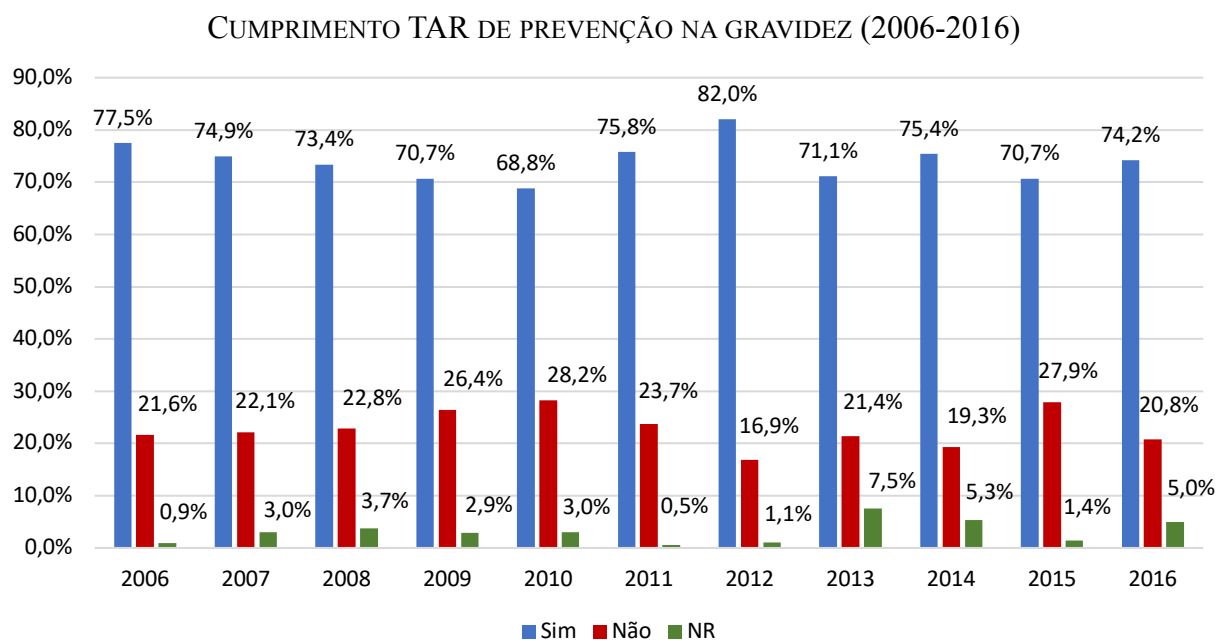


FIGURA 4.9: Distribuição das crianças atendendo ao cumprimento de TAR de prevenção na gravidez (sim, não e não refere (NR)) entre 2006-2016. Percentagens calculadas em função do número de casos /ano (total N=2250).

Ao relacionar o cumprimento TAR de prevenção na gravidez (sim e não) com o tipo de infecção materna (VIH-1 ou VIH-2), observou-se existir uma associação estatisticamente significativa entre a ausência de TAR de prevenção na gravidez e a infecção VIH-2 ($p=0,001$; Teste Exato de Fisher). Foi ainda analisada uma possível associação entre o cumprimento TAR de prevenção na gravidez (sim e não) e a ascendência das crianças (africana e portuguesa) de acordo com a naturalidade conhecida das respetivas mães, não se tendo verificado qualquer associação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($p=0,301$; Teste Exato de Fisher).

2.4.3 TIPOS DE REGIME DE TAR ADMINISTRADOS NA GRAVIDEZ

Analisando a informação disponível de 1249 casos em que se cumpriu a TAR de prevenção da TMF do VIH durante a gravidez (iniciada até às 12 semanas) e em que simultaneamente se conhecia o regime antirretrovírico administrado, observou-se que em 25,7% ($n=321$) dos casos foi seguido um esquema terapêutico com inibidores de RT (INTR e INNTR, por exemplo, AZT+3TC ou FTC+TDF com NVP ou EFV) (Código R1), em 69,8% ($n=872$) dos casos, o regime TAR administrado foi constituído por inibidores da RT em combinação com inibidores da PR (por exemplo, AZT+3TC ou FTC+TDF com LPV ou SQV) (código R2). Ainda em 1,6% ($n=20$) dos casos o regime TAR administrado continha inibidores da RT, PR e IN (por exemplo, FTC+TDF, ATV e RAL) (código R3) e em 2,9% ($n=36$) dos casos o regime TAR combinou inibidores da RT com inibidores de IN (por exemplo, FTC+TDF com RAL) (código R4). A distribuição do tipo de regime de TAR administrados na gravidez, designados de código R1, R2, e também de R3 e R4, entre 2006 e 2016, encontram-se apresentados na **Figura 4.10** e **Figura 4.11**.

REGIMES TAR DE PREVENÇÃO NA GRAVIDEZ (2006-2016)

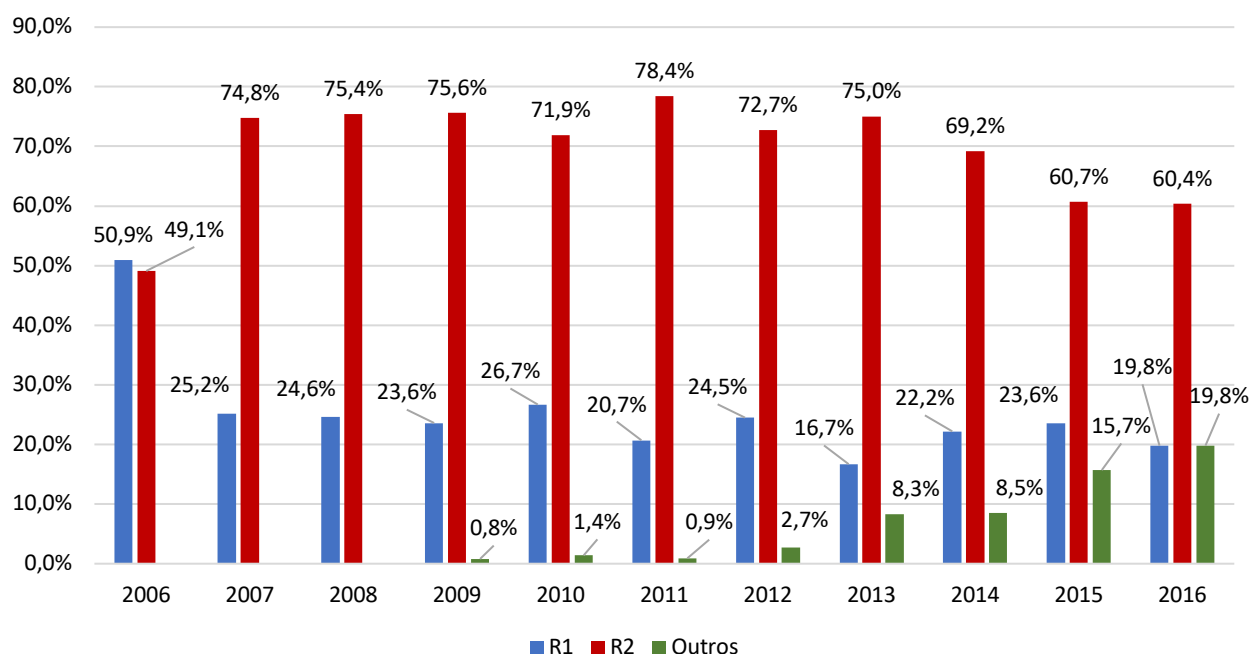


FIGURA 4.10: Distribuição dos regimes TAR de prevenção na gravidez (R1, inibidores RT (INTR e INNTR); R2, inibidores RT+ inibidores PR) e Outros (R3 + R4) entre o período de 2006 e 2016. Percentagens calculadas em função do número de casos/ano (total N=1249).

REGIMES TAR DE PREVENÇÃO NA GRAVIDEZ (2006-2016)

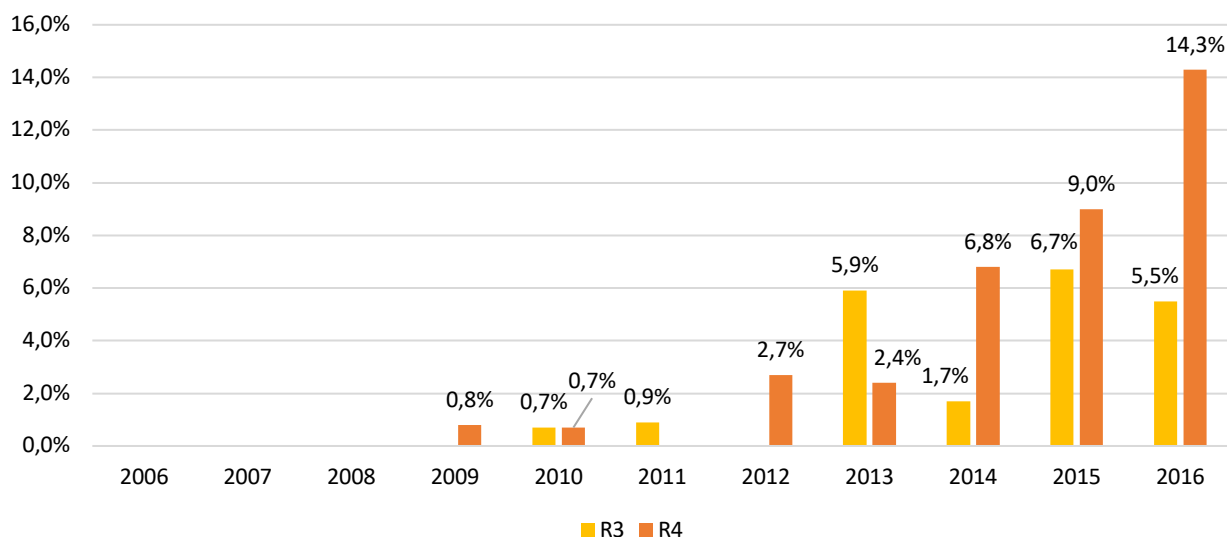


FIGURA 4.11: Distribuição dos regimes TAR de prevenção na gravidez (R3, inibidores da TR+PR+IN e R4, inibidores TR+IN) entre o período de 2006 e 2016. Percentagens calculadas em função do número de casos/ano (total N=1249).

2.4.4 ANÁLISE DA TAR DE PREVENÇÃO COM OS VALORES DE T CD4⁺ E DE RNA VIH-1

Considerando o número total de casos que não cumpriram TAR de prevenção (n=518), observou-se que 24,1% (n=125) apresentavam valores de células T CD4⁺ superiores a 500 células/mm³, 12,5% (n=65) apresentavam valores entre 350 e 500 células/mm³ e 12,9% (n=67) apresentavam um valor <350 células/mm³. Em 50,4% (n=261) dos casos esta informação não estava disponível (**Figura 4.12**).

Considerando o número total de casos que cumpriram TAR de prevenção (n=1664), observou-se que 35,4% (n=589) apresentavam valores de células T CD4⁺ superiores a 500 células/mm³, 12,9% (n=215) apresentavam valores entre 350 e 500 células/mm³ e 13,9% (n=231) apresentavam um valor <350 células/mm³. Em 37,8% (n=629) dos casos esta informação não estava disponível (**Figura 4.12**).

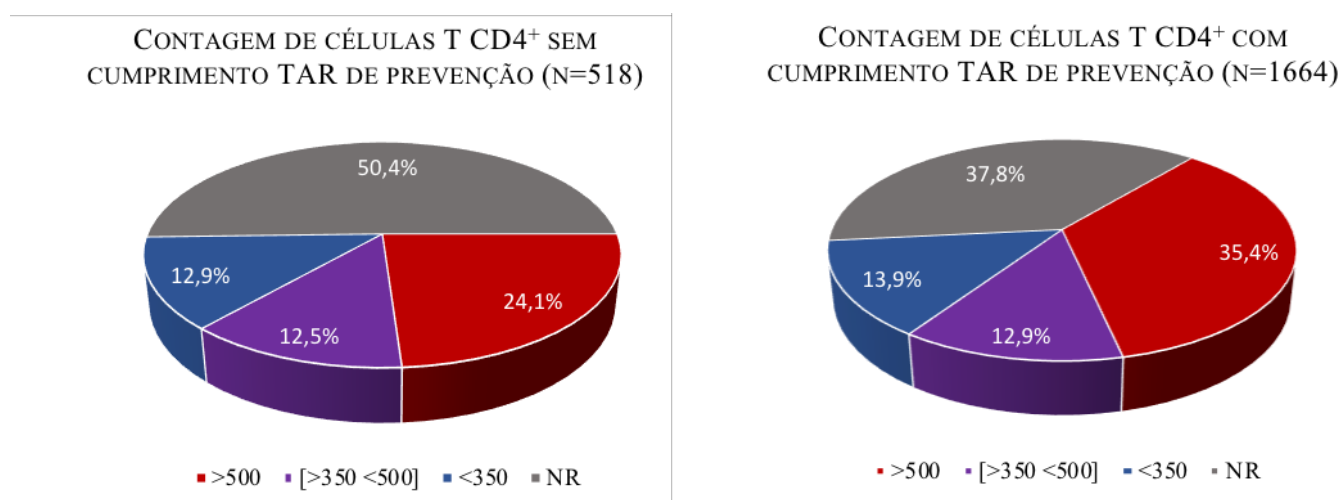


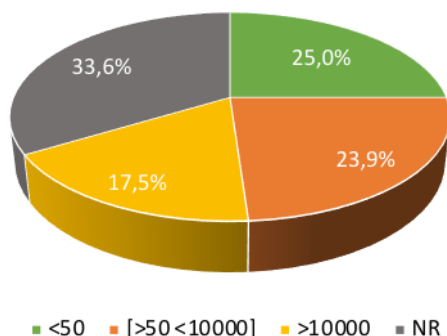
FIGURA 4.12: Contagem de células T CD4⁺ em função do cumprimento de TAR de prevenção durante a gravidez, na população de mães infectadas por VIH.

Analisou-se a relação entre o cumprimento da TAR de prevenção na gravidez (apenas para os casos com informação conhecida) com a contagem de células T CD4⁺ (inferiores a 350 células/mm³ ou superiores a 350 células/mm³), não se tendo verificado qualquer associação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis ($p=0,215$; Teste Exato de Fisher).

Considerando o número total de mães infectadas por VIH-1 e que não cumpriram TAR de prevenção no presente estudo (n=452), 25,0% (n=113) apresentavam uma carga viral indetetável (<50 cópias/mL), 23,9% (n=108) apresentavam uma carga viral entre 50 e 10000 cópias/mL e 17,5% (n=79) dos casos apresentavam valores de carga viral >10000 cópias/mL. Em 33,6% (n=152) dos casos esta informação não estava disponível (**Figura 4.13**).

Considerando o número total de mães infectadas por VIH-1 e que cumpriram TAR de prevenção (n=1584), 69,8% (n=1105) apresentavam uma carga viral indetetável (<50 cópias/mL), 17,0% (n=270) apresentavam uma carga viral entre 50 e 10000 cópias/mL e 3,8% (n=60) dos casos apresentavam valores de carga viral >10000 cópias/mL. Em 9,4% (n=149) dos casos esta informação não estava disponível (**Figura 4.13**).

QUANTIFICAÇÃO RNA VIH-1 SEM CUMPRIMENTO TAR DE PREVENÇÃO (N=452)



QUANTIFICAÇÃO RNA VIH-1 COM CUMPRIMENTO TAR DE PREVENÇÃO (N=1584)

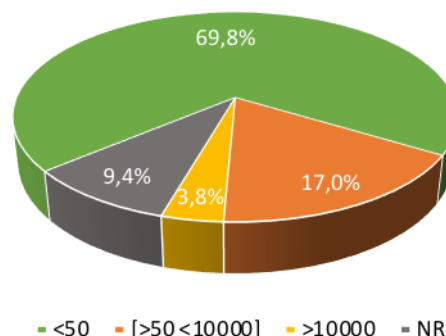


FIGURA 4.13: Quantificação de RNA VIH-1 em função do cumprimento TAR de prevenção na gravidez na população de mães infectadas por VIH-1.

A análise da relação entre o cumprimento TAR de prevenção na gravidez (sim ou não) e a quantificação do RNA viral materno (detetável e não detetável, respetivamente >50 cópias/mL e <50 cópias/mL) à data próxima do parto, mostrou existir uma associação estatisticamente significativa entre a ausência de prevenção e a carga viral detetável ($p=0,001$; Teste Exato de Fisher).

2.5 TAXAS DE TRANSMISSÃO MÃE-FILHO DO VIH, GLOBAIS E ANUAIS, ENTRE 2006 E 2016

Entre 2006 e 2016, foram analisadas amostras de sangue de um número total de 2250 crianças em risco de infeção VIH. O seguimento laboratorial para diagnóstico da TMF do VIH-1 e VIH-2 foi concluído em 85,2% ($n=1917$) das crianças, sendo que 1879 (98,0%) crianças apresentaram diagnóstico negativo e 2,0% ($n=38$) das crianças um diagnóstico positivo para VIH. Assim, no período de 11 anos do estudo, foram identificados 38 casos de transmissão mãe-filho do VIH, correspondendo a 37 crianças infectadas por VIH-1 e a uma criança infectada por VIH-2. A taxa de TMF do VIH-1 global foi de 2,1% (37 crianças em 1791 crianças em risco de infeção por VIH-1 e com seguimento laboratorial completo) e a taxa de TMF do VIH-2 foi de 0,9% (1 criança em 116 crianças em risco de infeção por VIH-2 e com seguimento laboratorial completo). As taxas anuais da TMF do VIH obtidas entre 2006 e 2016 encontram-se apresentadas na **Tabela 4.2**.

TABELA 4.2: Taxa da TMF do VIH obtida em cada ano de estudo, entre 2006 a 2016.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Taxa de transmissão VIH (%(n))	2,1% (4)	2,0% (4)	2,3% (5)	2,3% (5)	2,0% (5*)	1,8% (3)	0,6% (1)	0,7% (1)	2,0% (3)	3,8% (4)	2,6% (3)
Total de crianças**	188	204	218	215	246	171	169	137	147	106	116

* Inclui um caso de TMF do VIH-2; ** Taxas calculadas em função do total de crianças em risco de infeção por VIH-1 e/ou VIH-2 com seguimento laboratorial completo e diagnóstico concluído ($N=1917$).

Caracterizando o grupo de 38 crianças verticalmente infetadas, observou-se que 50,0% (n=19) eram do sexo feminino, 44,7% (n=17) do sexo masculino e para os restantes dois casos (5,3%) esta informação não era conhecida. No cálculo da idade média materna, verificou-se que era de 31,1 anos, com um mínimo de 18 anos e um máximo de 42 anos de idade. Atendendo à naturalidade das mães destas crianças verticalmente infetadas, observou-se que 34,2% (n=13) eram filhos de mães portuguesas, 36,8% (n=14) de mães com naturalidade africana e um caso (2,6%) era filho de uma mãe com naturalidade ucraniana. Em 26,3% (n=10) a origem geográfica das mães era desconhecida.

A maioria das crianças infetadas (84,2%; n=32) cumpriram regime profilático TAR de prevenção TMF do VIH, observando-se apenas 4 casos (10,5%) em que não foi administrado qualquer regime profilático. Estas 4 crianças eram filhas de mães que também não cumpriram integralmente a TAR de prevenção na gravidez. Verificou-se ainda 2 casos (5,3%) de crianças em que a informação sobre o regime profilático administrado não era conhecida.

Das 32 crianças que realizaram prevenção, 90,6% (n=29) o tipo de regime profilático era conhecido, constatando-se que 51,7% (n=15) cumpriram a monoterapia com AZT, 44,8% (n=13) o regime combinado com AZT+3TC+NVP e 3,5% (n=1) cumpriu um regime profilático constituído por AZT+3TC.

Relativamente ao cumprimento da TAR de prevenção da TMF do VIH durante a gravidez, observou-se que não houve cumprimento das medidas de prevenção em 79,0% (n=30) das crianças verticalmente infetadas por VIH, no entanto, verificou-se que em 7 casos (18,4%) ocorreu adesão materna às medidas de prevenção na gravidez. Para 1 caso (2,6%) de TMF do VIH-1, esta informação não era conhecida. Nos casos em que se cumpriu TAR de prevenção da TMF durante a gravidez, e se conhecia informação sobre os regimes de TAR administrados, 71,4% (n=5) seguiram o regime terapêutico combinado (inibidores RT e inibidores PR) (código R2).

A distribuição dos casos de transmissão mãe-filho de VIH-1 de acordo com o cumprimento de TAR de prevenção na gravidez, entre 2006 e 2016 (N=1746) encontra-se apresentada na **Tabela 4.3**.

TABELA 4.3: Distribuição dos casos de transmissão mãe-filho de VIH-1, de acordo com o cumprimento de TAR de prevenção na gravidez entre 2006 e 2016.

Cumprimento TAR na gravidez na população de mães infetadas por VIH-1					
Ano	Sim		Não		P Value
	Positivos n (%)	Total (n)	Positivos n (%)	Total (n)	
2006	1 (0,7)	137	3 (9,7)	31	0,020
2007	1 (0,7)	149	3 (9,1)	33	0,019
2008	1 (0,6)	154	4 (8,9)	45	0,010
2009	1 (0,7)	144	4 (8,0)	50	0,016
2010	0 (0)	157	4 (6,8)	59	0,005
2011	0 (0)	129	3 (9,1)	33	0,008
2012	1 (0,7)	138	0 (0)	26	1,000
2013	0 (0)	94	1 (4,0)	25	0,210
2014*	0 (0)	108	2 (8,0)	25	0,034
2015	0 (0)	75	4 (15,4)	26	0,004
2016	2 (2,3)	88	1 (5,0)	20	0,462
Total	7 (0,5)	1373	29 (7,8)	373	0,001

*Em 2014, ocorreu mais um caso de TMF do VIH-1 que não foi contabilizado por não existir informação disponível relativamente à TAR de prevenção durante a gravidez.

2.6 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E VIROLÓGICA NA POPULAÇÃO DE MÃES TRANSMISSORAS E NÃO TRANSMISSORAS DO VIH AOS SEUS FILHOS

No sentido de conhecer fatores associados à transmissão do VIH foi realizada uma análise comparativa entre a população de mães transmissoras (MT) e não transmissoras (MNT) do vírus aos seus filhos (**Tabela 4.4**), estudando as principais características epidemiológicas e clínicas (T CD4⁺, RNA VIH-1 e TAR de prevenção) dos dois grupos populacionais. Estes dados caracterizam de forma global a população materna infetada, especificamente por VIH-1 e por VIH-2, bem como a população de mães que transmitiram o vírus aos seus filhos. Na **Tabela 4.4** encontra-se ainda apresentada a caracterização geral das crianças em risco de infeção VIH e sua comparação com o grupo de crianças verticalmente infetadas (n=38). No entanto, os dados analisados correspondem a informação conhecida para cada uma das variáveis estudadas.

TABELA 4.4: Características epidemiológicas e clínicas da população de mães transmissoras e não transmissoras do VIH aos seus filhos, bem como das crianças em risco de infeção e crianças verticalmente infetadas.

CARACTERIZAÇÃO GLOBAL	POPULAÇÃO MÃES NÃO TRANSMISSORAS VIH % (n/N)	POPULAÇÃO MÃES TRANSMISSORAS VIH % (n/N)
Média de idade VIH-1	31,0 anos	31,1 anos
Média de idade VIH-2	33,0 anos	32,0 anos
Naturalidade Portuguesa	51,3% (1028/2004)	46,4% (13/28)
T CD4 ⁺ >500 células/mm ³	55,6% (715/1285)	29,4% (5/17)
T CD4 ⁺ <350 células/mm ³	22,7% (292/1285)	47,1% (8/17)
Cumprimento TAR (gravidez)	77,3% (1657/2144)	18,9% (7/37)
Regime TAR (ITR+IP)	74,2% (923/1244)	100% (5/5)
Regimes TAR (só ITR)	25,8% (321/1244)	0% (0/5)
RNA VIH-1 <50 cópias/mL	71,1% (1291/1815)	9,5% (2/21)
RNA VIH-1 >50 cópias/mL	28,9% (524/1815)	90,5% (19/21)

CARACTERIZAÇÃO GLOBAL	CRIANÇAS EM RISCO DE INFEÇÃO VIH % (n/N)	CRIANÇAS INFETADAS VIH % (n/N)
VIH-1	93,3% (2064/2212)	97,4% (37/38)
VIH-2	6,2% (138/2212)	2,6% (1/38)
VIH-1+VIH-2	0,5% (10/2212)	-
Sexo Feminino	49,3% (1071/2174)	51,4% (19/36)
Sexo Masculino	50,7% (1103/2174)	47,2% (17/36)
Ascendência africana	42,4% (850/2004)	50,0% (14/28)
Ascendência portuguesa	51,3% (1028/2004)	46,4% (13/28)
Profilaxia TAR (AZT)	87,4% (1837/2103)	51,7% (15/29)
Profilaxia TAR (INTR+INNTR)	10,6% (222/2103)	44,8% (13/29)
Profilaxia TAR (ITR+IP)	0,3% (7/2103)	0% (0/29)

Na análise da comparação entre a transmissão do VIH e algumas variáveis epidemiológicas, não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa entre a transmissão e o tipo de vírus (VIH-1 e VIH-2) ($p=0,728$; Teste Exato de Fisher), entre a transmissão e a naturalidade das mães (portuguesa e africana) ($p=0,561$; Teste Exato de Fisher), nem entre a transmissão e a distribuição das crianças por sexo ($p=0,738$; Teste Exato de Fisher).

No entanto, num espectro mais clínico, o não cumprimento de TAR de prevenção na gravidez foi estatisticamente associado à transmissão do VIH-1 ($p=0,001$; Teste Exato de Fisher), e foi ainda obtida uma associação estatisticamente significativa entre a transmissão do VIH-1 e a carga viral detetável (RNA VIH-1 >50 cópias/mL) ($p=0,001$; Teste Exato de Fisher). Por outro lado, na análise do estado imunitário materno, tendo em conta o número de células T CD4⁺, também se verificou uma associação estatisticamente significativa entre transmissão do vírus (VIH-1 ou VIH-2) e o número de células T CD4⁺ <350 células/mm³ ($p=0,036$; Teste Exato de Fisher).

Para os casos em que não houve administração de TAR de prevenção na gravidez e que simultaneamente se verificou carga viral detetável ($n=48$), ocorreu transmissão mãe-filho do VIH em 14,6% ($n=7$) dos casos, verificando-se que em 85,4% ($n=41$) não ocorreu transmissão do vírus.

Para os 7 casos em que ocorreu transmissão, verificou-se uma média e mediana de carga viral de, respetivamente, 148910 cópias/mL e 37450 cópias/mL e uma média e mediana de contagem de células T CD4⁺ de, respetivamente, 475,7 células/mm³ e 450 células/mm³.

Para os 41 casos em que não ocorreu transmissão, verificou-se uma média e mediana de carga viral de, respetivamente, 64414 cópias/mL e 19362 cópias/mL e uma média e mediana de contagem de células T CD4⁺ de, respetivamente, 527,5 células/mm³ e 466 células/mm³.

V. DISCUSSÃO

Na ausência de prevenção, o risco estimado de transmissão da infecção do VIH a uma criança nascida de mãe infetada pode rondar os 15-25%, ou subir para os 25-35%, se for considerado o tempo e a duração da amamentação. Com a administração de TAR de prevenção na grávida e recém-nascido verificou-se uma redução acentuada das taxas da TMF do VIH para valores que rondam os 1-2%.

Em Portugal, desde 1998, o então designado Laboratório de Referência da SIDA, e atualmente denominado de Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis do INSA, tem realizado o diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho do VIH-1 e VIH-2, analisando as amostras de sangue recebidas de crianças em risco de infecção, seguindo um protocolo laboratorial implementado a nível nacional, de forma a contribuir para uma vigilância da situação da TMF do VIH no país.

1. DIAGNÓSTICO PRECOCE DA TMF DO VIH, ENTRE 1 DE OUTUBRO DE 2017 A 31 DE MARÇO DE 2018

Entre outubro de 2017 e março de 2018, foram analisadas 325 amostras de sangue, que corresponderam a 223 amostras de crianças em risco de infecção VIH (97,8% para VIH-1; 1,8% para VIH-2 e 0,4% para VIH-1 e VIH-2) e 102 amostras maternas.

A informação epidemiológica conhecida para as 223 crianças, mostrou a existência de uma elevada percentagem de amostras (44,4%; n=99) de crianças com ascendência africana, refletindo a migração e a relação socioeconómica que Portugal possui com alguns países africanos, nomeadamente com as ex-colónias portuguesas, como a Guiné Bissau, Angola e Moçambique ^[49].

Atendendo às medidas de prevenção realizadas para a TMF do VIH correspondentes às 223 amostras de crianças, verificou-se que 79,4% (n=177), tinham feito ou estavam a cumprir profilaxia antirretrovírica e que os protocolos de prevenção da TMF do VIH foram seguidos durante a gravidez em 70,0% (n=156) dos casos. Relativamente às 177 crianças, verificou-se ainda que 48,6% (n=86) tinham ascendência africana. Para as 46 crianças que não cumpriram tratamento e/ou não era conhecido o regime profilático administrado, 28,3% (n=13) tinham origem africana. Para o mesmo grupo de 46 crianças, constatou-se ainda que na maioria dos casos os protocolos de prevenção da TMF do VIH na gravidez também não foram cumpridos.

Das 223 amostras de crianças em risco de infecção VIH analisadas, obteve-se uma amostra com resultado positivo para VIH-1, correspondendo a uma criança que não realizou profilaxia antirretrovírica de prevenção. A mãe, de naturalidade portuguesa, desconhecendo estar infetada, não seguiu qualquer regime de TAR de prevenção da TMF do VIH-1. O diagnóstico de transmissão do VIH-1 ao filho foi realizado numa primeira amostra enviada ao laboratório, colhida à criança já com 2 meses de vida. A transmissão do VIH-1 à criança poderá ter ocorrido *in utero*, durante o parto ou através da amamentação, uma vez que a mãe, por não conhecer o seu estado serológico, amamentou a criança até aos dois meses de idade. O desconhecimento do estado de infecção VIH materna e a consequente ausência de TAR de prevenção na gestação constituem grandes fatores de risco na transmissão mãe-filho do VIH. Este caso de transmissão enfatiza a elevada importância do diagnóstico da infecção VIH. Este deve ser realizado o mais precocemente possível para o planeamento e acompanhamento clínico adequado durante toda a gravidez, incluindo a vigilância materna pós-parto, no sentido de iniciar ou continuar o tratamento antirretrovírico, por forma a manter uma carga viral indetetável, preservar o sistema imunitário e evitar a progressão para SIDA ^[49].

A amostra positiva da criança, juntamente com a amostra materna, foi selecionada para uma caracterização molecular detalhada do VIH-1 em causa. As amostras foram submetidas a amplificação da região *gag*, *pol* (PR, RT e IN), *env* e *nef* de VIH-1.

Nas regiões *gag*, *pol* (RT), *env* e *nef* observou-se, desde logo, uma boa taxa de sucesso de amplificação, não se tendo verificado problemas experimentais. Pelo contrário, nas regiões PR e IN verificou-se existir uma maior dificuldade na obtenção de produtos amplificados. No entanto, após várias experiências laboratoriais e alteração dos programas de amplificação, foi possível obter amplificação destas duas regiões do VIH-1, apesar do aparecimento de algumas bandas inespecíficas resultantes da diminuição da temperatura de hibridação dos *primers* e consequente redução da especificidade da reação.

As amostras amplificadas foram purificadas e sequenciadas por metodologia Sanger, tendo sido possível construir as respetivas sequências de consenso para todas as regiões referentes ao par mãe-filho, exceto para a região PR em que só foi possível a obtenção da sequência de consenso para a amostra da criança. As sequências obtidas para a região PR derivada da amostra materna apresentavam cromatogramas com leitura de baixa qualidade, o que poderá dever-se à fraca concentração do fragmento alvo a analisar e simultaneamente à presença de várias bandas inespecíficas, facto já acima referido.

Após construção da árvore filogenética concatenada a partir de um alinhamento de sequências contendo as regiões *gag*, *pol* (RT e IN), *env* e *nef* de VIH-1, verificou-se que o par de sequências mãe-filho agrupou entre si, e que por sua vez, se observou estar incluído no *cluster* de sequências de referência CRF14_BG. Este recombinante teve origem em Portugal no início dos anos 90, pouco tempo depois do início da epidemia do VIH-1 no país, existindo na literatura estudos que revelaram uma elevada prevalência deste recombinante em Portugal e Espanha, no início do século XXI ^[109, 110]. No entanto, após o final da primeira década, verificou-se um decréscimo na frequência de infeções por este recombinante, tanto em Portugal como em Espanha ^[111, 112, 113].

Portugal apresenta um padrão de diversidade genética para o VIH-1 pouco comum quando comparado com os vários países da Europa, pois embora apresente frequência significativa do subtipo B, tal como é descrito ser o subtipo predominante na Europa, apresenta também uma prevalência elevada do subtipo G, fatos que provavelmente contribuíram para o aparecimento da CRF14_BG. Adicionalmente, um estudo realizado no norte do país veio demonstrar a predominância deste recombinante, face a outros tipos de recombinantes, nomeadamente, CRF02_AG, presentes na população infetada em Portugal ^[45]. Porém, estes dados poderão apenas resultar da proximidade geográfica entre esta região portuguesa e o norte de Espanha, onde predominam formas recombinantes BG, podendo não refletir o panorama a nível nacional da diversidade da infeção VIH-1. Outros estudos sugerem ainda que os vários subtipos e recombinantes do VIH-1 poderão apresentar diferentes taxas de transmissão mãe-filho ^[114]. Em particular, as formas recombinantes parecem ter maior probabilidade de serem transmitidos verticalmente da mãe ao filho através da amamentação, quando comparado com os subtipos A, C ou D ^[115]. Estudos realizados em Portugal já demonstraram a transmissão mãe-filho de recombinantes CRF14_BG e CRF02_AG ^[46].

A análise de mutações realizada às sequências derivadas do par de amostras mãe-filho, demonstrou não existir qualquer mutação que conferisse resistência a fármacos alvo para a RT e IN, verificando-se 4 mutações, de potencial resistência, para alvos dirigidos à PR – K20I, M36L, H69K e L89M relativamente à criança. Estas mutações não conferem níveis significativos de resistência quando presentes isoladamente, no entanto, em conjunto, podem conferir uma diminuição da suscetibilidade do vírus aos inibidores da PR. Neste caso, e de acordo com o algoritmo ANRS, as mutações M36L, H69K e L89M conferem resistência ao fármaco tripanavir e a mutação K20I resistência ao fármaco atazanavir.

Analisando informação conhecida, verificamos que a mãe e a criança, ambas infetadas pelo recombinante CRF14_BG, não estiveram expostas a qualquer pressão terapêutica seletiva sugerindo uma possível infeção por uma estirpe que apresentava mutações de resistência, sendo por sua vez, transmitida à criança. No entanto, e pelos motivos já referidos, não foi possível realizar a análise de mutações de resistência para a região PR da amostra materna. Na literatura foi descrito que a mutação K20I foi frequentemente observada em sequências do subtipo G e CRF02_AG^[116] ao passo que a mutação L89M foi observada como sendo um polimorfismo natural de subtipos não B^[117]. Adicionalmente, as mutações K20I, L89M e H69K foram identificadas em estudos realizados no contexto de transmissão mãe-filho do VIH^[118]. A mutação M36L encontra-se também descrita em estudos que a associam a sequências do subtipo não-B^[119].

2. ESTUDO DA TRANSMISSÃO MÃE-FILHO DO VIH, ENTRE 2006 E 2016

O estudo desenvolvido foi retrospectivo e pretendeu realizar uma análise da evolução da situação em Portugal na área de transmissão mãe-filho do VIH-1 e VIH-2 para os últimos 11 anos, verificar as alterações nas medidas de TAR de prevenção implementadas e determinar as taxas globais e anuais de TMF do VIH, bem como, avaliar os principais fatores que influenciam a transmissão do vírus da mãe à criança.

a) ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

Na avaliação retrospectiva dos dados disponíveis relativos ao período de tempo em análise, verificou-se que foram recebidas amostras de sangue de 2250 crianças nascidas de mães infetadas por VIH. A grande maioria (93,4%; 2101) correspondia a crianças em risco de infeção por VIH-1, verificando-se ainda que 139 (6,2%) crianças apresentavam risco de infeção por VIH-2 e 10 (0,4%) crianças um risco de infeção por VIH-1 e VIH-2, atendendo a que nasceram de mães com dupla infeção por VIH-1 e VIH-2.

A caracterização do grupo de crianças em estudo revelou uma distribuição por sexo semelhante, sendo 49,8% crianças do sexo masculino e 48,4% do sexo feminino.

As mães destas crianças apresentaram uma média de idade de 31,1 anos, variando entre um mínimo de 15 anos e um máximo de 50 anos de idade. No caso das mães infetadas por VIH-1, a média de idades era de 31,0 anos, e para as mães infetadas por VIH-2, a média de idades era 33,0 anos. Verificou-se que a idade média materna para a população de crianças em risco de infeção por VIH-2, comparativamente a VIH-1, foi anualmente sempre superior, variando de um mínimo de 30,4 anos de idade (em 2007) para um máximo de 36,6 anos de idade (em 2012). Observou-se ainda que em média, as mães infetadas por VIH-2 estavam infetadas há mais tempo, comparativamente ao tempo médio de infeção das mães infetadas por VIH-1. A média de tempo de infeção das mães infetadas por VIH-2 foi de 9,7 anos, apresentando uma mediana de 8,5 anos e variando entre um mínimo de 1 ano e um máximo de 38 anos, ao passo que a média de tempo de infeção das mães infetadas por VIH-1 foi de 6,3 anos, apresentando uma mediana de 5 anos e variando entre um mínimo de 1 ano e um máximo de 22 anos. Em termos globais, para o total de crianças em risco de infeção VIH, observou-se um aumento na idade materna ao longo do tempo, passando-se de uma média de 29,8 anos de idade obtida em 2007, para uma média de 33,0 anos de idade obtida em 2016.

Foi observada uma elevada proporção de crianças com ascendência africana. Das 2101 mães infetadas por VIH-1, 35,4% (n=743) apresentavam naturalidade africana e das 139 mães infetadas por VIH-2, 79,9% (n=111) apresentavam naturalidade africana. Verificou-se ainda, que anualmente, embora sofrendo oscilações, a população de crianças com ascendência africana em risco de infeção VIH-1 se manteve entre os 33,3% (em 2011) e os 45,7% (em 2015). Uma associação estatisticamente significativa ($p=0,001$) foi obtida entre a infeção pelo VIH-2 e a naturalidade africana. Apesar da infeção por VIH-2 estar associada a uma proporção significativa de crianças com ascendência portuguesa, estes resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram uma associação entre a infeção por VIH-2 e a naturalidade africana de indivíduos residentes no país ^[49].

A associação estatisticamente significativa verificada entre a infeção por VIH-2 e a naturalidade africana, juntamente com o facto das mães infetadas por VIH-2 apresentarem idade e um tempo de infeção superior (infeções mais antigas) quando comparadas com as mães infetadas por VIH-1, corrobora dados descritos na literatura que indicam uma menor prevalência da infeção VIH-2 na África ocidental, particularmente em pessoas mais novas, onde se verificou em simultâneo, um aumento da transmissão pelo VIH-1 ^[37].

b) ANÁLISE CLÍNICA E VIROLÓGICA

A profilaxia de TAR de prevenção foi cumprida em 97,0% (n=2182), o que corresponde à esmagadora maioria das crianças em estudo. Apenas 1,0% (n=22) das crianças não cumpriram a prevenção profilática. Destes 22 casos, 72,7% (n=16) são crianças nascidas de mães que também não cumpriram TAR de prevenção na gravidez. Deste modo, verificou-se que na maioria dos casos em que foi reportada ausência de profilaxia antirretrovírica corresponde a crianças nascidas de mães que não fizeram vigilância adequada durante a gravidez ou TAR de prevenção da TMF do VIH.

Entre 2006 e 2010 verificou-se que a administração da profilaxia foi mantida durante as primeiras 6 semanas de vida do recém-nascido. Entre 2011 e 2016, verificou-se uma redução do tempo de profilaxia para 4 semanas, no entanto, durante todo o período de 11 anos em análise, o regime profilático mais frequentemente administrado foi a monoterapia por AZT a 86,9% das crianças em estudo.

A duração de seis semanas de profilaxia TAR no recém-nascido foi adotada após os excelentes resultados de ensaio PCTG 076. No entanto, em ensaios clínicos posteriores, verificou-se não existir risco adicional de transmissão do VIH ao cumprir um regime profilático de duração mais curta. As recomendações portuguesas para o tratamento da infeção VIH/SIDA sugerem desde 2011 uma administração profilática com AZT durante 4 semanas, em cenários de baixo risco de transmissão, particularmente quando a grávida realizou TAR de prevenção na gravidez, apresentando um valor de carga viral < 1000 cópias/mL ^[84]. Em cenários opostos, quando a mãe não realizou tratamento durante a gravidez, ou quando este foi iniciado tardiamente, ou ainda, quando a carga viral materna se apresenta detetável, é recomendado ao recém-nascido uma administração de regimes profiláticos combinados (por exemplo, AZT+3TC+NVP), geralmente num período de 6 semanas ^[65].

O regime profilático administrado aos recém-nascidos com maior frequência durante os 11 anos em análise foi o regime monoterapêutico de AZT (86,9%; n=1852). Este fármaco é recomendado a todos os recém-nascidos, independentemente da resistência materna ao AZT, uma vez que as mães com mutações de resistência a este fármaco apresentam também uma subpopulação de vírus suscetível, podendo esta ser preferencialmente transmitida à descendência ^[84]. Em situações especiais deve considerar-se a administração de outros regimes profiláticos ao recém-nascido, como por exemplo AZT+3TC (4 semanas) + NVP (2 semanas) ^[65].

Na população em estudo foi observado que 11,0% das crianças seguiram uma profilaxia antirretrovírica combinada, contendo inibidores da RT (INTR e INNTR), maioritariamente esquemas de AZT+3TC+NVP, administrado em proporções semelhantes durante 2007 a 2016, não se observando qualquer incremento significativo na sua administração ao longo do tempo. No entanto, a escolha de um regime profilático combinado administrado ao recém-nascido deve depender do passado terapêutico da mãe (exposição anterior a antirretrovirais e perfil de resistências) e do seu estado clínico, principalmente respeitante ao valor de carga viral quantificado próximo à data do parto [84].

No presente estudo, o cumprimento de TAR durante a gravidez variou entre 68,8% em 2010 e 82,0% em 2012, verificando-se uma percentagem global de 74,0%. Deste modo, verifica-se que ainda existe uma elevada proporção de casos de ausência de TAR de prevenção da TMF do VIH na população de grávidas infetadas por VIH. A percentagem global de grávidas que não cumpriram tratamento foi de 23,0%, variando entre 16,9% em 2012 e 28,2% em 2010. Verificou-se que no último ano em análise, a proporção de ausência de prevenção da TMF do VIH na grávida foi ainda de 20,8%. Estes resultados são preocupantes, principalmente quando comparados com outros estudos efetuados em países desenvolvidos, onde as proporções de ausência de prevenção na gravidez eram inferiores a 10% [73, 74, 75, 76], todavia, este cenário de elevada proporção de ausência de TAR de prevenção durante a gravidez já foi descrito anteriormente para Portugal [49].

Muitas grávidas conhecem o seu diagnóstico de infeção VIH tardiamente, impedindo a adoção de medidas terapêuticas e de prevenção atempadas e adequadas para diminuição do risco de TMF do VIH, apesar das recomendações portuguesas salientarem a importância na realização de testes para o VIH no primeiro e terceiro trimestre de gravidez [120]. De facto, os rastreios pré-natais de VIH são componentes cruciais na prevenção da transmissão mãe-filho, permitindo avaliar o estado clínico da mulher infetada e, caso necessário, iniciar ou adequar os regimes antirretrovíricos de prevenção ao tratamento da infeção VIH/SIDA.

No presente estudo, ao relacionar o cumprimento de TAR de prevenção na gravidez (sim e não) com o tipo de infeção materna (VIH-1 ou VIH-2), observou-se existir uma associação estatisticamente significativa entre o não cumprimento de TAR de prevenção na gravidez e a infeção VIH-2 ($p=0,001$). Neste estudo, constatou-se ainda não haver associação estatisticamente significativa entre o cumprimento TAR de prevenção na gravidez (sim e não) e a ascendência das crianças (africana e portuguesa) ($p=0,301$). Para 23,0% das crianças em risco de infeção VIH que não foram cumpridas as medidas de prevenção na gravidez, observou-se que em 45,0% dos casos não foi administrada TAR, em 43,6% o regime TAR foi iniciado tardiamente na gravidez e em 11,4% dos casos a toma foi irregular, verificando-se respetivamente nestes grupos que, 41,2%, 46,9% e 55,9% correspondiam a crianças de ascendência portuguesa.

Os regimes administrados às grávidas que cumpriram TAR de prevenção na gravidez foram maioritariamente regimes combinando ITR com IP. A partir de 2006, verificou-se uma redução da proporção da administração de regimes contendo apenas inibidores RT (INTR + INNTR), onde até então este esquema terapêutico constituía a primeira linha no tratamento de VIH [121].

Os esquemas antirretrovíricos combinados de elevada eficácia, denominados de HAART foram adotados em Portugal, a partir de 2002 [49] e constituem também os esquemas mais frequentemente administrados no Brasil, Espanha e Reino Unido [75, 76, 77].

Embora haja evidência de que os esquemas iniciais de tratamento baseados em INNTR possuem uma durabilidade e eficácia prolongada, é necessário ter em conta a baixa barreira genética desta classe de fármacos e o consequente risco da seleção de populações virais com mutações de resistência. Nesse contexto, a elevada barreira genética conferida pelos IP, principalmente quando potenciados, é uma forte razão para a sua inclusão nos esquemas de tratamento.

Neste estudo observou-se que os regimes combinados de ITR com IIN ou ITR e IP com IIN começaram a ser administrados a partir de 2013. Apesar da experiência de utilização de inibidores da IN na gravidez ser ainda algo limitada, estudos recentes indicam que os IIN, principalmente o RAL, é um fármaco bem tolerado com um potencial de interações medicamentosas baixo^[122], que incorporado num regime combinado de ITR ou de ITR com IP se apresenta como uma boa alternativa. Este fármaco tem elevada capacidade de rápida redução de carga viral, e ainda a vantagem de conseguir atravessar a placenta, apresentando-se como um agente profilático pré-exposição do feto, tendo vindo a afirmar-se nos últimos anos como um fármaco a considerar para os esquemas terapêuticos na prevenção da transmissão mãe-filho do VIH^[123, 124].

A contagem de células T CD4⁺ e a quantificação do RNA VIH são fundamentais na avaliação clínica do indivíduo infetado por VIH, uma vez que conduzem a um prognóstico na evolução da doença, sendo ainda importantes na avaliação e monitorização da eficácia do tratamento. Relativamente aos valores de células T CD4⁺, a população de mães infetadas por VIH-1 e a população de mães infetadas por VIH-2 apresentaram um espectro imunológico semelhante, verificando-se que mais de 55% das mães de cada um dos grupos apresentou uma contagem de células T CD4⁺ superior a 500 células/mm³. Foi ainda realizada uma análise sobre a influência do cumprimento de TAR de prevenção na gravidez e os valores de células T CD4⁺. A proporção de mães que cumpriram TAR de prevenção na gravidez com um número de células T CD4⁺ superior a 500 células/mm³ foi maior quando comparado com as mães que não cumpriram tratamento (respetivamente 35,4% e 24,1%). Por outro lado, a proporção de mães que cumpriram TAR de prevenção na gravidez com um número de células T CD4⁺ inferior a 350 células/mm³ foi ligeiramente maior quando comparado com as mães que não cumpriram tratamento (respetivamente 13,9% e 12,9%).

O cumprimento TAR de prevenção na gravidez não é por si só suficiente para manter os níveis de células T CD4⁺ normais, uma vez que é importante que o esquema administrado esteja a ser eficaz (monitorizado pela carga viral). Outro fator a ter em consideração é o tempo de infeção das mães que, neste caso, foi superior entre as mães que cumpriram TAR de prevenção, quando comparado com o grupo de mães que não realizaram TAR de prevenção (respetivamente 7,73 anos e 3,13 anos). Com efeito, ao analisar-se a relação entre o cumprimento da TAR de prevenção na gravidez com a contagem de células T CD4⁺ (inferiores a 350 células/mm³ ou superiores a 350 células/mm³), não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis ($p=0,215$).

Relativamente à quantificação de RNA VIH-1 conhecido à data do parto para a população materna, constatou-se que 70,2% ($n=1231$) das mães apresentam carga viral indetetável. No caso de mães com carga viral detetável, a maioria (56,1%) delas apresentava um número de cópias relativamente baixo, entre 50 e 1000 cópias/mL. Curiosamente, e não sendo uma situação esperada, verificou-se que nas grávidas que não cumpriram TAR de prevenção, 25,0% apresentaram uma carga viral indetetável, correspondendo a grávidas em que não foi administrada TAR, grávidas que realizaram um tratamento numa fase tardia da gravidez ou em grávidas que realizaram TAR de prevenção de forma irregular. Por outro lado, e de acordo com o esperado, das grávidas que cumpriram TAR de prevenção, 69,8% apresentavam carga viral indetetável, observando-se existir uma associação estatisticamente significativa entre a ausência de TAR de prevenção e a carga viral detetável ($p=0,001$). Estes valores destacam, uma vez mais, a importância à adesão das grávidas aos esquemas terapêuticos TAR de prevenção ou tratamento para a supressão da replicação vírica reduzindo o risco de transmissão do VIH-1 aos filhos. Em contraste, 20,8% das mães em que se reportou o cumprimento do tratamento antirretrovírico apresentaram uma carga viral detetável. Esta situação pode sugerir a administração de um esquema de tratamento inadequado, ou eventualmente, o desenvolvimento de algum nível de resistência a fármacos com diminuição da sua eficácia para a completa supressão vírica.

c) CASOS DE TMF DO VIH NA POPULAÇÃO ESTUDADA

As taxas anuais e globais da TMF do VIH-1 e VIH-2 obtidas neste estudo foram calculadas para os casos de crianças com diagnóstico concluído (seguimento laboratorial completo). Das 2250 crianças envolvidas no estudo, o diagnóstico foi concluído para 85,2% (n=1917) das crianças. Foram diagnosticadas 38 crianças infetadas por via da transmissão mãe-filho (37 crianças infetadas por VIH-1 e 1 criança infetada por VIH-2). Não ocorreu nenhum caso de transmissão em crianças nascidas de mães com dupla infeção por VIH-1 e VIH-2, sendo a taxa global de TMF do VIH obtida de 2%. Entre 2006 e 2016, a taxa de TMF para VIH-1 foi de 2,1% e a taxa de TMF para VIH-2 foi de 0,9%. Neste estudo não foi verificada qualquer associação estatisticamente significativa entre a transmissão e o tipo de vírus ($p=0,728$). A baixa taxa de transmissão do VIH-2 obtida no presente estudo sugere o descrito anteriormente para este vírus, indicando que o VIH-2 possui um potencial de transmissibilidade mais reduzido, comparativamente ao VIH-1, sendo a transmissão por este tipo de vírus um acontecimento considerado mais raro, mesmo na ausência de prevenção ou tratamento [37, 49].

Num estudo realizado para os anos de 1999 a 2005 as taxas de TMF do VIH globais descritas em Portugal foram de 3,4% para o VIH-1 e 1,5% para o VIH-2, verificando-se uma redução significativa das taxas de 7,0% obtida em 1999 para 0,5% obtida em 2005 [49], demonstrando o impacto positivo da TAR na prevenção da TMF do VIH no nosso país.

Os resultados da TMF do VIH neste estudo não são significativamente muito diferentes dos descritos para outros países desenvolvidos, nomeadamente na Tailândia, Brasil, Espanha e Reino Unido, onde se verificou, respetivamente, taxas de transmissão de 1,9%, 1,9%, 1,6% e uma redução de 1,2% entre 2000 e 2006 para 0,6% entre 2007 e 2011 no Reino Unido [74, 75, 76 e 77]. No presente estudo, a taxa de TMF do VIH variou entre 0,6% obtida em 2012 e 3,8% obtida em 2015, sendo obtida uma taxa de 2,6% para o último ano de 2016 em análise. Interessantemente, a taxa mais baixa (0,6%) de TMF do VIH obtida em 2012 corresponde ao ano em que se verificou um maior cumprimento de TAR de prevenção na gravidez (82,0%), e em contraste, taxas mais elevada (3,8% em 2015) de TMF do VIH em anos em que se verificou menor adesão à TAR de prevenção. Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a ausência de TAR de prevenção e a TMF do VIH-1 ($p=0,001$).

Os resultados das taxas de TMF do VIH-1 analisados anualmente, entre 2006 e 2016, revelaram diferenças estatisticamente significativas (com a exceção dos anos 2012, 2013 e 2016) quando a transmissão do VIH-1 foi comparada na população que cumpriu e na população que não cumpriu as medidas de TAR de prevenção, sendo obtidas taxas globais de TMF do VIH-1, respetivamente de 0,5% e 7,8% ($p=0,001$) nestas duas populações. No presente estudo, a transmissão do VIH-1 está fortemente associada à ausência de medidas de prevenção na gravidez. Ainda assim, para o grupo de mães que não realizou regime TAR de prevenção na gravidez (excluindo os casos de mães com início tardio ou cumprimento irregular do tratamento) e que simultaneamente apresentou carga viral detetável (n=48), verificou-se que apenas em 14,6% (n=7) dos casos ocorreu transmissão mãe-filho do VIH, verificando-se que em 85,4% (n=41) dos casos não ocorreu transmissão. Para este grupo de mães que não transmitiu o vírus, verificou-se ainda que a média e mediana dos valores de carga viral foi de, respetivamente 64414 e 19362 cópias/mL.

Estes valores demonstram, por um lado, o elevado número de casos em que não ocorreu transmissão do vírus, apesar das mães não terem realizado qualquer tratamento durante a gravidez, sugerindo, por outro lado, a existência de outros fatores importantes a influenciar a TMF do VIH por exemplo, fatores obstétricos ou neonatais [76]. No entanto, a informação sobre estes fatores não estava disponível para análise. Foi ainda possível analisar alguns fatores epidemiológicos na TMF do VIH, nomeadamente o sexo das crianças e a naturalidade portuguesa ou africana das mães, não se tendo encontrado qualquer associação estatisticamente significativa entre a transmissão do VIH e a o sexo das crianças ($p=0,738$), nem a naturalidade das mães das crianças estudadas ($p=0,561$).

Analisando o grupo dos 38 casos de transmissão mãe-filho do VIH diagnosticados entre 2006 e 2016, verificou-se que apenas em 7 (18,4%) casos ocorreu cumprimento TAR de prevenção. Embora a informação não seja conhecida para um dos casos de TMF do VIH-1, nos restantes 30 (79,0%) casos, não houve qualquer adesão terapêutica como medida de prevenção da TMF do VIH.

O grupo de 30 casos de TMF correspondente a mães que não realizaram TAR de prevenção na gravidez, em grande parte dos casos, apresentaram simultaneamente valores baixos de células T CD4⁺ (<350 células/mm³) e carga viral detetável (>50 cópias/mL).

A ausência de TAR de prevenção pode refletir uma vigilância da gravidez deficiente, desconhecimento atempado do diagnóstico de infeção VIH na mãe, ou em alguns casos, pode dever-se ao acesso limitado aos regimes terapêuticos e/ou consultas pré-concepcionais, uma vez que se verificou que destes 30 casos, 12 correspondiam a mães com naturalidade africana. É reconhecido que muitas grávidas chegam ao país em estado avançado da gravidez com objetivo de terem um parto em melhores condições relativamente aos seus países de origem. Nestes casos, acresce ainda o fator sociocultural respeitante à amamentação dos recém-nascidos que em algumas etnias africanas não existe fácil adesão à recomendação da privação de amamentação dos filhos, implementada nos países europeus.

Analisando especificamente os 7 casos de TMF do VIH em que foram seguidos medidas de prevenção, na grávida e na criança, verificou-se que em dois dos casos não se conheciam o regime administrado à grávida, observando-se que, num deles, não se conhecia os valores de carga viral, sendo o valor de células T CD4⁺ = 670 células/mm³, e, no outro caso, verificou-se uma carga viral de 3570 cópias/mL e um valor de células T CD4⁺ = 317 células/mm³. Para os restantes 5 casos (71,4%), as mães seguiram o regime terapêutico combinado de inibidores da RT com inibidores da PR, estando disponível a seguinte informação:

- a)** AZT+3TC+IDV/r; Carga viral indetetável; Valor de células T CD4⁺ = 475 células/mm³;
- b)** AZT+3TC+RTV; Carga viral e valor de células T CD4⁺ desconhecidos;
- c)** AZT+3TC+SQV/r; Carga viral = 595980 cópias/mL; Valor de células T CD4⁺ desconhecido;
- d)** AZT+3TC+LPV/r; Carga viral = 810000 cópias/mL; Valor de células T CD4⁺ = 563 células/mm³;
- e)** FTC+TDF+LPV/r; Carga viral indetetável; Valor de células T CD4⁺ = 376 células/mm³.

Os casos em que as mães foram administradas com os regimes **c)** e **d)**, ao apresentarem uma carga viral >100000 cópias/mL podem refletir esquemas terapêuticos de baixa eficácia, nestes casos específicos, pela eventual presença de estirpes virais resistentes.

As mães administradas com os regimes **a)** e **e)**, apesar de apresentarem uma carga viral indetetável e um número de células T CD4⁺ compreendido entre 350 e 500 células/mm³, transmitiram o vírus aos seus filhos, o que demonstra que a transmissão do vírus pode ocorrer mesmo com níveis indetetáveis de carga viral no organismo, indicando a implicação de outros fatores no risco de transmissão mãe-filho, nomeadamente fatores virológicos, genéticos e imunológicos.

VI. CONCLUSÃO

Entre outubro de 2017 e março de 2018, seguindo a algoritmo de diagnóstico precoce do VIH estabelecido no laboratório do INSA, foi diagnosticado um caso de TMF do VIH-1. O diagnóstico da infecção VIH materno foi efetuado apenas após o nascimento da criança, não tendo sido implementada qualquer medida de prevenção da TMF na grávida nem no recém-nascido, observando-se adicionalmente potenciais mutações de resistências aos IP. Estas observações enfatizam a importância do diagnóstico precoce da infecção VIH, sobretudo em jovens em idade fértil, bem como uma monitorização da infecção e vigilância de variantes virais com mutações de resistência aos antirretrovíricos para uma melhoria da prevenção da transmissão do vírus.

No período de 2006 a 2016 verificou-se 38 casos de TMF do VIH, o que resulta numa taxa de transmissão de 2,0%, taxa esta semelhante à encontrada em vários países desenvolvidos que implementaram medidas de prevenção da transmissão do VIH da mãe ao filho. Ao longo do período de 11 anos de estudo foi diagnosticado apenas um caso de TMF do VIH-2, embora se tenha observado na população de grávidas infetadas por VIH-2 uma reduzida adesão à TAR de prevenção. Estes resultados estão de acordo com vários estudos publicados na literatura, em que associaram um baixo potencial de transmissibilidade do VIH-2, comparativamente ao VIH-1.

Ao longo dos 11 anos foi possível constatar diferenças entre a população de mães não transmissoras e a população de mães transmissoras do VIH aos seus filhos, particularmente no aspeto imunológico (T CD4⁺) e clínico (RNA VIH-1 e TAR), não se verificando diferenças a nível epidemiológico (idade, naturalidade). Porém, observou-se que a população materna infetada por VIH-2, comparativamente à infetada por VIH-1, apresentava uma média de idade superior com aquisição da infecção VIH-2 há mais tempo.

A TMF do VIH continua a ocorrer em Portugal e encontra-se fortemente associada à ausência TAR de prevenção, ao número baixo de células T CD4⁺, bem como, à carga viral detetável, sendo estes fatores importantes marcadores na monitorização da infecção VIH/SIDA, podendo influenciar a TMF do VIH.

No presente estudo, observou-se uma elevada proporção de casos com ausência de TAR de prevenção na gravidez. Embora algumas das razões possam estar associadas a mulheres que chegaram a Portugal no período final da gravidez e que não foram seguidas clinicamente no seu país de origem, outros motivos existem, por exemplo, o diagnóstico tardio da infecção VIH e a seroconversão na gravidez (desconhecimento da infecção VIH no parceiro) em mulheres residentes no país, e estes resultados são preocupantes. Uma estratégia mais efetiva e proactiva deveria ser implementada para a redução do número de casos de grávidas infetadas que não fazem prevenção da TMF do VIH. Estas mulheres teriam recursos e condições no sistema nacional de saúde para fazer o diagnóstico precoce, bem como o tratamento/prevenção e a monitorização da infecção, e desta forma não perder a oportunidade de reduzir significativamente o risco de transmissão do VIH da mãe ao filho. Com esta estratégia poder-se-ia contribuir para atingir as metas propostas pela OMS no sentido da eliminação desta via de transmissão.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axlerblin, C., Vezinetbrun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871. <http://doi.org/10.1126/science.6189183>
- [2] Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., & Sharp, P. M. (2000). AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*, 287(5453), 607-614. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.607>
- [3] Levy, J. A. (2009). HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS*, 23(2), 147-160. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283217f9f>
- [4] Castro-Nallar, E., Pérez-Losada, M., Burton, G. F., & Crandall, K. A. (2012). The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(2), 777-792. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.019>
- [5] Azevedo-Pereira, J. M. (2011). Ciclo Biológico de VIH. In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 13-29). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [6] Clavel F, Guetard, D., Brunvezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L., & Montagnier, L. (1986). Isolation of a New Human Retrovirus from West-African Patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343-346. <https://doi.org/10.1126/science.2425430>
- [7] Organização Mundial de Saúde – Repositório de dados da observação global de saúde. Número de pessoas (todas as idades) a viver com VIH. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.22100WHO?lang=em> [Acedido a 24 de julho de 2018].
- [8] Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y. L., Rondenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436-441. <https://doi.org/10.1038/17130>
- [9] Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 182-192. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>
- [10] Taveira, N., Borrego, P., & Bártolo, I. (2011). Biologia molecular de VIH. In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 31-52). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [11] Foley, B., Leitner, T., Apetrei, C., Hahn, B., Mizrachi, I., Mullins, J., Rambaut, A., Wolinsky, S., & Korber, B., (Eds) (2018). *HIV Sequence Compendium 2018*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Lab, NM, LA-UR-18-25673.
- [12] Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural Biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 1-32. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2354>
- [13] Taveira, N., Rocha, C., Pádua, E., & Jani, I. V. (2014). Retrovírus. In Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N., (Coord.), *Microbiologia Médica* (Volume 2, Cap. 57, pp. 221-240). Lisboa: LIDEL.
- [14] Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 484-496. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3490>

- [15] Dayer, M. R. (2016). Comparison of newly assembled full length HIV-1 integrase with prototype foamy virus integrase: structure-function prospective. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(5), e29773. <http://doi.org/10.5812/jjm.29773>
- [16] Yilmaz, N. K., Swanstrom, R., & Schiffer, C. A. (2016). Improving viral protease inhibitors to counter drug resistance. *Trends in Microbiology*, 24(7), 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.010>
- [17] Bieniasz, P. D. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 550-558. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.015>
- [18] Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 279-290. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- [19] Götte, M., Li, X., & Wainberg, M. A. (1999). HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(2), 199-210. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1209>
- [20] Sarafianos, S. G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D. M., Parniak, M. A., Hughes, S. H., & Arnold, E. (2009). Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 385(3), 693-713.
- [21] Antirretrovíricos para o VIH aprovados pela FDA. Disponível em: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines> [Acedido a 1 de agosto de 2018].
- [22] Malet, I., Calvez, V., & Marcelin, A. G. (2012). The future of integrase inhibitors of HIV-1. *Current Opinion in Virology*, 2(5), 580-587. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.005>
- [23] Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686), 648-659. <http://doi.org/10.1038/31405>
- [24] Bagaya, B. S., Vega, J. F., Tian, M., Nickel, G. C., Li, Y., Krebs, K. C., Arts, E. J., & Gao, Y. (2015). Functional bottlenecks for generation of HIV-1 intersubtype *Env* recombinants. *Retrovirology*, 12(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0170-8>
- [25] Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(1-6), 13-33.
- [26] Williamson, S. (2003). Adaptation in the env gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression. *Molecular Biology and Evolution*, 20(8), 1318-1325. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg144>

- [27] Tersmette, M. J., De Goede, R. E., Al, B. J., Winkel, I. N., Gruters, R. A., Cuypers, H. T., Huisman, H. G., & Miedema, F. (1988). Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Journal of Virology*, 62(6), 2026-2032.
- [28] Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, D. S., Cao, Y., Koup, R. A., & Ho, D. D. (1993). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*, 261(5125), 1179-1181. <http://doi.org/10.1126/science.8356453>
- [29] Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., & Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, 391(6665), 344-345. <http://doi.org/10.1038/34814>
- [30] Geyer, M., Fackler, O. T., & Peterlin, B. M. (2001). Structure–function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Reports*, 2(7), 580-585. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kve141>
- [31] Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)601641](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)601641)
- [32] De Sousa, A. E., & Victorino, R. (2011). Imunopatogénese e resposta imunitária. In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 55-76). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [33] Global AIDS Update 2017. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Disponível em: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/Global_AIDS_update_2017_en.pdf [Acedido a 18 de setembro de 2018].
- [34] Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C. C., Dia, M. C., Gueye, E., Hellinger, J., Gueyendiaie, A., Sankale, J. L., Ndoye, I., Mboup, S., & Essex, M. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, 265(5178), 1587-1590. <https://doi.org/10.1126/science.7915856>
- [35] Gomes P. (2002). Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2 (HIV-2). 3rd HIV-AIDS Virtual Congress.
- [36] Taveira, N., & Ferreira, M.O. (2011). Diversidade genética de VIH. In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 3-12). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [37] Campbell-Yesufu, O. T., & Gandhi, R. T. (2011). Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical Infectious Diseases*, 52(6), 780-787. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq248>
- [38] Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), 871-872. <http://doi.org/10.1038/nm.2016>

- [39] Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., & Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, 288(5463), 55-57. <http://doi.org/10.1126/science.288.5463.55d>
- [40] Tebit, D. M., & Arts, E. J. (2011). Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infectious Diseases*, 11(1), 45-56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70186-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70186-9)
- [41] Martins, H. C. (2011). Distribuição mundial dos genótipos (epidemiologia molecular de VIH). In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 87-92). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [42] Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., & Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, 288(5463), 55-55. <http://doi.org/10.1126/science.288.5463.55d>
- [43] Base de dados de sequências VIH de *Los alamos* – Formas recombinantes em circulação (CRFs). Disponível em: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> [Acedido a 2 de agosto de 2018].
- [44] Junqueira, D. M., & de Matos Almeida, S. E. (2016). HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology*, 495, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.05.003>
- [45] Carvalho, A., Costa, P., Triunfante, V., Branca, F., Rodrigues, F., Santos, C. L., Correia-Neves, M., Saraiva, M., Lecour, H., Castro, A. G., Pedrosa, J. & Osório, N. S. (2015). Analysis of a Local HIV-1 Epidemic in Portugal Highlights Established Transmission of non-B and- G Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1506-1514. <http://doi.org/10.1128/JCM.03611-14>
- [46] Bártolo, I., Abecasis, A. B., Borrego, P., Barroso, H., McCutchan, F., Gomes, P., Camacho, R., & Taveira, N. (2011). Origin and epidemiological history of HIV-1 CRF14_BG. *PLoS One*, 6(9), e24130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024130>
- [47] Delgado, E., Thomson, M. M., Villahermosa, M. L., Sierra, M., Ocampo, A., Miralles, C., Rodríguez-Pérez, R., Diz-Aren, J., Ojea-de Castro, R., Losada, E., Cuevas, M. T., Vázquez-de Parga, E., Carmona R., Pérez-Alvarez, L., Medrano, L., Cuevas, L., Taboada, J. A., & Nájera, R. (2002). Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *Journal of Acquired Immune Deficiency syndromes*, 29(5), 536-543. <http://10.1097/00126334-200204150-00016>
- [48] Abecasis, A. B., Wensing, A. M., Paraskevis, D., Vercauteren, J., Theys, K., Van de Vijver, D. A., Camacho, R. J., Clotet, B., De Gascun, C., Griskevicius, A., Grossman, Z., Hamouda, O., Horban, A., Kolupajeva, T., Korn, K., Kostrikis, L. G., Kücherer, C., Liitsola, K., Linka, M., Nielsen, C., Otelea, D., Paredes, R., Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E., Schmit, J.-C., Sönnernborg, A., Stanekova, D., Stanojevic, M., Struck, D., Boucher, C. A. B., & Vandamme, A.-M. (2013). HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-7>

- [49] Pádua, E., Almeida, C., Nunes, B., Martins, H. C., Castela, J., Neves, C., & Paixão, M. T. (2009). Assessment of mother-to-child HIV-1 and HIV-2 transmission: an AIDS reference laboratory collaborative study. *HIV Medicine*, 10(3), 182–190. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2008.00669.x>
- [50] Fernández-García, A., Delgado, E., Cuevas, M. T., Vega, Y., Montero, V., Sánchez, M., Carrera, C., López-Álvarez, M. J., Miralles, C., Pérez-Castro, S., Cilla, G., Hinojosa, C., Pérez-Álvarez, L., & Thomson, M. M. (2016). Identification of an HIV-1 BG intersubtype recombinant form (CRF73_BG), partially related to CRF14_BG, which is circulating in Portugal and Spain. *PloS One*, 11(2), e0148549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148549>
- [51] Thomson, M. M., & Nájera, R. (2001). Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into Western countries. *Clinical Infectious Diseases*, 32(12), 1732-1737. <https://doi.org/10.1086/320764>
- [52] Thomson, M. M., & Nájera, R. (2007). Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe. *Journal of Infectious Diseases*, 196(8), 1120-1124. <https://doi.org/10.1086/521683>
- [53] Paixão, M. T., & Pádua, E. (2011). Transmissão da infecção por VIH. In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 105-113). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [54] Jaffe, H. W., Bregman, D. J., & Selik, R. M. (1983). Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *Journal of Infectious Diseases*, 148(2), 339-345. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.2.339>
- [55] Ammann, A. J., Cowan, M. J., Wara, D. W., Weintrub, P. E. G. G. Y., Dritz, S. E. L. M. A., Goldman, H., & Perkins, H. A. (1983). Acquired immunodeficiency in an infant: possible transmission by means of blood products. *The Lancet*, 1(8331), 956-958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92082-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92082-2)
- [56] Thorne, C., Newell, M.-L. (2007). HIV. *Seminars Fetal & Neonatal Medicine*, 12, 174-181.
- [57] Gray, G. E., & McIntyre, J. A. (2007). Pregnancy plus - HIV and pregnancy. *British Medical Journal*, 334(7600), 950-953. <https://doi.org/10.1136/bmj.39176.674977.AD>
- [58] Antunes, F., Zagalo, A., & Afonso, C. (2011). Terapêutica anti-retrovírica na mulher grávida e prevenção da transmissão mãe-filho. In Antunes, F., (Ed.), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 467-477). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [59] Adjorlolo-Johnson, G., De Cock, K. M., Ekpini, E., Vetter, K. M., Sibailly, T., Brattegaard, K., Yavo, D., Doorly, R., Whitaker, P., Ou, C. Y., George, J. R., Gayle, H. D. (1994). Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *Jama*, 272(6), 462-466. <http://doi:10.1001/jama.1994.03520060062033>
- [60] Macassa, E. (2011). Transmissão da infecção por VIH/sida da mãe para o filho, em países em vias de desenvolvimento. In Antunes, F., (Ed), *Manual sobre SIDA* (4ª edição, pp. 453-466). Lisboa: Permanyer Portugal.
- [61] Loreto, S., & Azevedo-Pereira, J. M. (2012). A infecção por HIV—importância das fases iniciais e do diagnóstico precoce. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 1(2), 5-17.

- [62] Ministério da Saúde Brasil. (2016). Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV - 3ª edição. Brasília – DF. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/node/57787>. [Acedido a 18 de setembro de 2018].
- [63] Nourse, C. B., & Butler, K. M. (1998). Perinatal transmission of HIV and diagnosis of HIV infection in infants: a review. *Irish Journal of Medical Science*, 167(1), 28-32.
- [64] Nesheim, S. R. (1996). The diagnosis and management of perinatal HIV infection. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 39(2), 396-410.
- [65] Coordenação Nacional para a infeção VIH/SIDA. (2015). Recomendações Portuguesas para o tratamento da infeção VIH/SIDA. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/recomendacoes-portuguesas-para-o-tratamento-da-infecao-por-vih-1-e-vih-2-versao-10-2015.aspx>. [Acedido a 18 de setembro de 2018].
- [66] Musoke, P., Namukwaya, Z., & Mosha, L. B. (2018). Prevention and Treatment of Pediatric HIV Infection. *Current Tropical Medicine Reports*, 5(1), 24-30. <https://doi.org/10.1007/s40475-018-0137-7>
- [67] Connor, E. M., Sperling, R. S., Gelber, R., Kiselev, P., Scott, G., O'sullivan, M. J., VanDyke, R., Bey, M., Shearer, W., Jacobson, R. L., Jimenez, E., O'Neill, E., Bazin, B., Delfraissy, J.-F., Culnane, M., Coombs, R., Elkins, M., Moye, J., Stratton, P., Balsley, J. (1994). Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *New England Journal of Medicine*, 331(18), 1173-1180. <http://doi.org/10.1056/NEJM199411033311801>
- [68] Newell, M. L. (1998). Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. *Aids*, 12(8), 831-837. <http://doi.org/10.1097/00002030-199808000-00004>
- [69] Cooper, E. R., Charurat, M., Mofenson, L., Hanson, I. C., Pitt, J., Diaz, C., Hayani, K., Handelsman, E., Smeriglio, V., Hoff, R., & Blattner, W. (2002). Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 29(5), 484-494.
- [70] Mehellou, Y., & De Clercq, E. (2009). Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go?. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(2), 521-538. <http://doi.org/10.1021/jm900492g>
- [71] Beghin, J. C., Yombi, J. C., Ruelle, J., & Van der Linden, D. (2018). Moving forward with treatment options for HIV-infected children. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(1), 27-37. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1377181>
- [72] Ford, N., Ball, A., Baggaley, R., Vitoria, M., Low-Beer, D., Penazzato, M., Vojnov, L., Bertagnolio, S., Habiyaambere, V., Doherty, M., & Hirschall, G. (2017). The WHO public health approach to HIV treatment and care: looking back and looking ahead. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), e76-e86. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30482-6)
- [73] Organização Mundial de Saúde - Dados e estatísticas do VIH. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/data/en/> [Acedido a 26 de julho de 2018].
- [74] Thisyakorn, U. (2017). Elimination of mother-to-child transmission of HIV: lessons learned from success in Thailand. *Paediatrics and International Child Health*, 37(2), 99-108. <https://doi.org/10.1080/20469047.2017.1281873>

- [75] Melo, V. H., Maia, M. M. M., Correa Júnior, M. D., Kakehasi, F. M., Ferreira, F. G. F., Andrade, B. A. M. D., Scaramussa, F. S., Ferreira, F. A. M., Messias, A. A., & Pinto, J. A. (2018). Vertical Transmission of HIV-1 in the Metropolitan Area of Belo Horizonte, Brazil: 2006-2014. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 40(2), 59-65. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0037-1613689>
- [76] Prieto, L. M., González-Tomé, M. I., Muñoz, E., Fernández-Ibiza, M., Soto, B., Del Rosal, T., Cuadrado, I., Navarro, M. L., Roa, M. A., Beceiro, J., de José, M. I., Santos, M. J., Lora, D., & Ramos, J. T. (2012). Low rates of mother-to-child transmission of HIV-1 and risk factors for infection in Spain: 2000–2007. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(10), 1053-1058. <http://doi.org/10.1097/INF.0b013e31826fe968>
- [77] Townsend, C. L., Byrne, L., Cortina-Borja, M., Thorne, C., de Ruiter, A., Lyall, H., Taylor, G. P., Peckham, C. S., & Tookey, P. A. (2014). Earlier initiation of ART and further decline in mother-to-child HIV transmission rates, 2000–2011. *Aids*, 28(7), 1049-1057. <http://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000212>
- [78] Katlama, C., Deeks, S. G., Autran, B., Martinez-Picado, J., van Lunzen, J., Rouzioux, C., Miller, M., Vella, S., Schmitz, J. E., Ahlers, J., Richman, D. D., & Sekaly, R. P. (2013). Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. *The Lancet*, 381(9883), 2109-2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60104-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60104-X)
- [79] Sollai, S., Noguera-Julian, A., Galli, L., Fortuny, C., Deyà, Á., de Martino, M., & Chiappini, E. (2015). Strategies for the prevention of mother to child transmission in Western countries: an update. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(5), S14-S30. <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000000661>
- [80] Nesheim, S., Harris, L. F., & Lampe, M. (2013). Elimination of perinatal HIV infection in the USA and other high-income countries: achievements and challenges. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 8, 447-456. <http://doi.org/10.1097/COH.0b013e3283636ccb>
- [81] Warszawski, J., Tubiana, R., Le Chenadec, J., Blanche, S., Teglas, J. P., Dollfus, C., Faye, A., Burgard, M., Rouzioux, C., & Mandelbrot, L. (2008). Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *Aids*, 22(2), 289-299. <http://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f3d63c>
- [82] Chiappini, E., Galli, L., Lisi, C., Gabiano, C., Giaquinto, C., Giacomet, V., Buffolano, W., Esposito, S., Badolato, R., Barbardi, S., Cellini, M., Dodi, I., Faldella, G., Osimani, P., Genovese, O., Nicastro, E., Viscoli, C., Salvini, F., Tovo, P.-A., & de Martino, M. (2011). Risk of perinatal HIV infection in infants born in Italy to immigrant mothers. *Clinical Infectious Diseases*, 53(3), 310-313. <https://doi.org/10.1093/cid/cir349>
- [83] Iyidogan, P., & Anderson, K. S. (2014). Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses*, 6(10), 4095-4139. <http://doi.org/10.3390/v6104095>
- [84] Coordenação Nacional para a infecção VIH/SIDA. (2011). Recomendações Portuguesas para o tratamento da infecção VIH/SIDA. Disponível em: http://www.sermais.pt/media/86/File/Prevencao/Recomendacoes_2011.pdf. [Acedido a 18 de setembro de 2018].
- [85] Weidle, P. J., & Nesheim, S. (2010). HIV drug resistance and mother-to-child transmission of HIV. *Clinics in Perinatology*, 37(4), 825-842. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2010.08.009>

- [⁸⁶] Shah, S. S., Crane, M., Monaghan, K., & McGowan, J. P. (2004). Genotypic resistance testing in HIV-infected pregnant women in an urban setting. *International Journal of STD & AIDS*, 15(6), 384-387. <https://doi.org/10.1258/095646204774195236>
- [⁸⁷] Weinberg, A., Forster-Harwood, J., McFarland, E. J., Pappas, J., Davies, J. K., Kinzie, K., Barr, E. A., Paul, S. M., Salbenblatt, C. R., Soda, E., Vazquez, A., & Levin, M.J. (2009). Resistance to antiretrovirals in HIV-infected pregnant women. *Journal of Clinical Virology*, 45(1), 39-42. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.02.009>
- [⁸⁸] Welles, S. L., Bauer, G. R., LaRussa, P. S., Colgrove, R. C., & Pitt, J. (2007). Time trends for HIV-1 antiretroviral resistance among antiretroviral-experienced and naive pregnant women in New York City during 1991 to early 2001. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 44(3), 329-335. <http://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31802f1296>
- [⁸⁹] Oliveros, M. (2009). *Evolução das mutações de resistência aos inibidores de protease em pacientes infectados pelo HIV-1 subtipo F*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [⁹⁰] Mirochnick, M., Thomas, T., Capparelli, E., Zeh, C., Holland, D., Masaba, R., Odhiambo, P., Fowler, M. G., Weidle, P. J., & Thigpen, M. C. (2009). Antiretroviral concentrations in breast-feeding infants of mothers receiving highly active antiretroviral therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1170-1176.
- [⁹¹] Bulterys, M., Weidle, P. J., Abrams, E. J., & Fowler, M. G. (2005). Combination antiretroviral therapy in African nursing mothers and drug exposure in their infants: new pharmacokinetic and virologic findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(5), 709-712. <https://doi.org/10.1086/432490>
- [⁹²] Shapiro, R. L., Holland, D. T., Capparelli, E., Lockman, S., Thior, I., Wester, C., Stevens, L., Peter, T., Essex, M., Connor, J. D. & Mirochnick, M. (2005). Antiretroviral concentrations in breast-feeding infants of women in Botswana receiving antiretroviral treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(5), 720-727. <https://doi.org/10.1086/432483>
- [⁹³] Wensing, A. M., Calvez, V., Günthard, H. F., Johnson, V. A., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2017). 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in Antiviral Medicine*, 24(4), 132-141.
- [⁹⁴] Berry, N., Ariyoshi, K., Jaffar, S., Sabally, S., Corrah, T., Tedder, R., & Whittle, H. (1998). Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *Journal of Human Virology*, 1(7), 457-468.
- [⁹⁵] Semple, M., Loveday, C., Weller, I., & Tedder, R. (1991). Direct measurement of viraemia in patients infected with HIV-1 and its relationship to disease progression and zidovudine therapy. *Journal of Medical Virology*, 35(1), 38-45. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890350109>
- [⁹⁶] Berry, N., Ariyoshi, K., Jobe, O., Ngum, P. T., Corrah, T., Wilkins, A., Whittle, H & Tedder, R. (1994). HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4⁺ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(8), 1031-1037. <https://doi.org/10.1089/aid.1994.10.1031>

- [97] Heyndrickx, L., Janssens, W., Zekeng, L., Musonda, R., Anagonou, S., Van der Auwera, G., Coppens, S., Vereecken, K., De Witte, K., Van Rampelbergh, R., Kahindo, M., Morison, L., McCutchan, F. E., Carr, J. K., Albert, J., Essex, M., Goudsmit, J., Asjö, B., Salminen, M., & Buvé, A. (2000). Simplified Strategy for Detection of Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Isolates by gag/env Heteroduplex Mobility Assay. *Journal of Virology*, 74(1), 363-370. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.1.363-370.2000>
- [98] Steegen, K., Demecheleer, E., De Cabooter, N., Nges, D., Temmerman, M., Ndumbe, P., Mandaliya, K., Plum, J., & Verhofstede, C. (2006). A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *Journal of Virological Methods*, 133(2), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.11.004>
- [99] Videira e Castro, S. (2010). *Anti-retrovirais inibidores enzimáticos de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- [100] Burns, C. C., Gleason, L. M., Mozaffarian, A., Giachetti, C., Carr, J. K., & Overbaugh, J. (2002). Sequence variability of the integrase protein from a diverse collection of HIV type 1 isolates representing several subtypes. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(14), 1031-1041. <https://doi.org/10.1089/08892220260235399>
- [101] Delwart, E. L., Shpaer, E. G., Louwagie, J., McCutchan, F. E., Grez, M., Rubsamen-Waigmann, H., & Mullins, J. I. (1993). Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science*, 262(5137), 1257-1261. <http://doi.org/10.1126/science.8235655>
- [102] Parreira, R., Pádua, E., Piedade, J., Venenno, T., Paixão, M. T., & Esteves, A. (2005). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef in Portugal: subtyping, identification of mosaic genes, and amino acid sequence variability. *Journal of Medical Virology*, 77(1), 8-16. <https://doi.org/10.1002/jmv.20408>
- [103] Chromas Lite 2.6.5 – Technelysium. Software de sequenciação de DNA. Disponível em: <https://technelysium.com.au/wp/chromas/> [Acedido a 18 de setembro de 2018].
- [104] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- [105] Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- [106] Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120. <http://doi.org/10.1007/BF01731581>
- [107] Obermeier, M., Pironti, A., Berg, T., Braun, P., Däumer, M., Eberle, J., Ehret, R., Kaiser, R., Kleinkauf, N., Korn, C., Kücherer, C., Müller, H., Noah, C., Stürmer, M., Thielen, A., Wolf, E., & Walter, H. (2012). HIV-GRADE: a publicly available, rules-based drug resistance interpretation algorithm integrating bioinformatic knowledge. *Intervirology*, 55(2), 102-107. <https://doi.org/10.1159/000331999>
- [108] Base de dados de sequências VIH de Los alamos – Blast VIH. Disponível em: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html [Acedido a 25 de julho].

- [109] Esteves, A., Parreira, R., Piedade, J., Venenno, T., Franco, M., Germano de Sousa, J., Patrício, L., Brum, P., Costa, A & Canas-Ferreira, W. F. (2003). Spreading of HIV-1 Subtype G and env B/gag G Recombinant Strains among Injecting Drug Users in Lisbon, Portugal. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19(6), 511-517. <https://doi.org/10.1089/088922203766774568>
- [110] Antunes, R., Figueiredo, S., Bárto, I., Pinheiro, M., Rosado, L., Soares, I., Lourenço, H., & Taveira, N. (2003). Evaluation of the clinical sensitivities of three viral load assays with plasma samples from a pediatric population predominantly infected with human immunodeficiency virus type 1 subtype G and BG recombinant forms. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3361-3367. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3361-3367.2003>
- [111] Palma, A. C., Araujo, F., Duque, V., Borges, F., Paixao, M. T., & Camacho, R. (2007). Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(3), 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.01.009>
- [112] Abecasis, A. B., Martins, A., Costa, I., Carvalho, A. P., Diogo, I., Gomes, P., & Camacho, on behalf of the Portuguese HIV-1 Resistance Study Group, R. J. (2011). Molecular epidemiological analysis of paired pol/env sequences from Portuguese HIV type 1 patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 27(7), 803-805. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0312>
- [113] Cuevas, M. T., Fernández-García, A., Pinilla, M., García-Alvarez, V., Thomson, M., Delgado, E., González-Galeano, M., Miralles, C., Serrano-Bengoechea, E., Ojea de Castro, R., López-Álvarez, M. J., Lezáun, M. J., Sánchez-García, A. M., Sánchez-Martínez, M., Muñoz-Nieto, M., & Pérez-Alvarez, L. (2010). Biological and genetic characterization of HIV type 1 subtype B and nonsubtype B transmitted viruses: Usefulness for vaccine candidate assessment. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 26(9), 1019-1025. <http://doi.org/10.1089/aid.2010.0018>
- [114] Renjifo, B., Gilbert, P., Chaplin, B., Msamanga, G., Mwakagile, D., Fawzi, W., & Essex, M., (2004). Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *Aids*, 18(12), 1629-1636. <http://doi.org/10.1097/01.aids.0000131392.68597.34>
- [115] Koulinska, I. N., Villamor, E., Msamanga, G., Fawzi, W., Blackard, J., Renjifo, B., & Essex, M. (2006). Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes. *Virus Research*, 120(1-2), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.03.007>
- [116] Bertoli, A., M. Santoro, P. Lorenzini, F. Ceccherini-Silberstein, A. Lazzarin, G. Di Perri, D. Esposito, P. Caramello, A. Cargme, A. Cargnel, P. Narciso, G. Rizzrdini, G. Filice, L. Minoli, G. Carosi, A. Antinori, and C.F. Perno. (2006). Different patterns of mutations involved in the genotypic resistance score for atazanavir boosted versus atazanavir unboosted in multiplying failing patients. HIVDRW2006.
- [117] Marcelin, A. G., Masquelier, B., Descamps, D., Izopet, J., Charpentier, C., Alloui, C., Bouvier-Alias, M., Signori-Schmuk, A., Montes, B., Chaix, M.-L., Amiel, C., Dos Santos, G., Ruffault, A., Barin, F., Peytavin, F., Lavignon, M., Flandre, P., & Calvez, V. (2008). Tipranavir-ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9), 3237-3243. <http://doi.org/10.1128/AAC.00133-08>

- [¹¹⁸] Simporé, J., Pietra, V., Pignatelli, S., Karou, D., Nadembega, W. M. C., Ilboudo, D., Ceccherini-Silberstein, F., Ghilat-Avoid-Belem, W. N., Bellocchi, M. C., Saleri, N., Sanou, M. J., Ouedraogo, C. M., Nikiema, J. B., Colizzi, V., Perno, C. P., Castelli, F., & Musumeci, S. (2007). Effective program against mother-to-child transmission of HIV at Saint Camille Medical Centre in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology*, 79(7), 873-879. <https://doi.org/10.1002/jmv.20913>
- [¹¹⁹] Vergne, L., Diagbouga, S., Kouanfack, C., Aghokeng, A., Butel, C., Laurent, C., Noumssi, N., Tardy, M., Sawadogo, A., Drabo, J., Hien, H., Zekeng, L., Delaporte, E., & Peeters, M. (2006). HIV-1 drug-resistance mutations among newly diagnosed patients before scaling-up programmes in Burkina Faso and Cameroon. *Antiviral Therapy*, 11(5), 575-579.
- [¹²⁰] Direccção-Geral Saúde (2004). Gravidez e Vírus da Imunodeficiência Humana. Circular Normativa N11/DSMIA. Disponível em: www.dgs.pt. [Acedido a 18 de setembro de 2018].
- [¹²¹] Gilks, C. F., Crowley, S., Ekpini, R., Gove, S., Perriens, J., Souteyrand, Y., Sutherland, D., Vitoria, M., Guerma, T., & De Cock, K. (2006). The WHO public-health approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings. *The Lancet*, 368(9534), 505-510. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69158-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69158-7)
- [¹²²] Nóbrega, I., Travassos, A. G., Haguihara, T., Amorim, F., & Brites, C. (2013). Use of raltegravir in late-presenting HIV-infected pregnant women. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 29(11), 1451-1454. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0059>
- [¹²³] Cecchini, D. M., Martinez, M. G., Morganti, L. M., & Rodriguez, C. G. (2017). Antiretroviral therapy containing raltegravir to prevent mother-to-child transmission of HIV in infected pregnant women. *Infectious Disease Reports*, 9(2), 50-52. <http://doi.org/10.4081/idr.2017.7017>
- [¹²⁴] Puthanakit, T., Thepnarong, N., Chaithongwongwatthana, S., Anugulruengkitt, S., Anunsittichai, O., Theerawit, T., Ubolyam, S., Pancharoen, C., & Phanuphak, P. (2018). Intensification of antiretroviral treatment with raltegravir for pregnant women living with HIV at high risk of vertical transmission. *Journal of Virus Eradication*, 4(2), 61-65.